



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

***Mentha cervina* L.**

Insectos e fungos associados

Propriedades insecticidas do óleo essencial

Sara Inês Pereira Belchior

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Agronómica

Orientadora: Doutora Ana Maria da Silva Monteiro, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Co-Orientador: Doutor José Carlos Franco Santos Silva, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Manuela Rodrigues Branco Simões, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Ana Maria da Silva Monteiro, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa; Doutor Arlindo Lima, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa; Doutor José Carlos Franco Santos Silva, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Lisboa, 2009

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Ana Monteiro, por quem tenho grande admiração, por todos os ensinamentos ao longo dos últimos anos, pelo rigor, exigência, simpatia, pelo exemplo de coragem e pelo grande incentivo aos alunos que desejam ir mais além.

Ao meu co-orientador, Professor José Carlos Franco, por quem tenho grande admiração, por todos os ensinamentos ao longo dos últimos anos, pelo rigor, exigência, simpatia e pelo discurso cativante que me despertou o interesse pela entomologia.

À Eng^a Filomena Caetano, por quem tenho grande admiração e que tive o privilégio de conhecer na sequência da realização do presente trabalho e cujo contributo para o mesmo foi muito importante, por todos os ensinamentos, pelo rigor, exigência e simpatia.

À Eng^a Maria dos Anjos Ferreira, pela identificação dos ácaros.

À Professora Margarida Moldão, pela simpatia e disponibilidade.

À Eng^a Leandra Rodrigues, pela simpatia, disponibilidade e pela identificação dos compostos do óleo essencial.

À Eng^a Vera Zina, pela simpatia, disponibilidade e pela identificação das formigas.

À Eng^a Marta Rocha, pela simpatia e apoio ao longo do trabalho.

Ao Sr. Manuel Cariano, pelo apoio técnico no Laboratório de Entomologia.

Ao Paulo Forte, pelo apoio técnico no Herbário.

À D. Amélia Marques, ao Sr. Joaquim Antunes e à D. Olga Nogueira, pela simpatia e disponibilidade.

À D. Teresa Inês, pela simpatia e disponibilidade.

Aos meus colegas e amigos, pelo fantástico ambiente de camaradagem vivido durante os anos de curso, que nunca esquecerei. Em particular, aos meus amigos Catarina Pepo, Irina Gomes e Rúben Rocha, por todo o apoio nas fases importantes da minha vida, pela cumplicidade e grande amizade.

Ao Leonel, pelo apoio incondicional, generosidade, compreensão por todos os momentos roubados durante os últimos anos e por me ter ensinado que “não existem limites para sonhar”.

Aos meus Pais, sempre presentes.

Obrigada.

RESUMO

Os objectivos do presente trabalho consistiram em determinar as propriedades repelentes/insecticidas do óleo essencial (OE) de *Mentha cervina* L. em formigas e em identificar, em cultura, os insectos e os fungos associados a *M. cervina*. Procedeu-se ainda ao levantamento de insectos associados a algumas populações *M. pulegium* L., também em cultura.

Nos estudos sobre as propriedades repelentes/insecticidas em formigas das espécies *Tapinoma nigerrimum* Nylander e *Aphaenogaster senilis* Mayr utilizaram-se as seguintes concentrações de OE: 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 µg/cm². Verificou-se algum efeito de repelência nas concentrações intermédias, os valores de mortalidade mais elevados ocorreram na concentração mais baixa.

As amostragens dos insectos associados a *M. cervina* e foram realizadas nos meses de Julho, Setembro, Outubro e Novembro de 2008, semanalmente. A maioria dos insectos identificados pertence às ordens Coleoptera e Hemiptera. Ácaros também foram identificados em *M. cervina*, pertencentes a quatro famílias e quatro espécies.

O levantamento dos fungos associados a *M. cervina* foi efectuado durante os meses de Outubro e Novembro de 2007. Nos géneros de fungos identificados predominaram *Alternaria* e *Fusarium*. Estes dois géneros e as espécies *Colletotrichum coccodes* e *Sclerotinia sclerotiorum* estão referenciadas como doenças de *Mentha* spp..

Palavras-chave: *Mentha pulegium* L., octopamina, pulegona, plantas aromáticas

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate repellent/insecticidal effect of *Mentha cervina* L. essential oil against ants; to identify fungi and insects associated to *M. cervina* as crop.

The toxic and repellent properties of *M. cervina* essential oil were evaluated against the ant species *Tapinoma nigerrimum* Nylander and *Aphaenogaster senilis* Mayr and the following concentrations of 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ were essayed. Contact toxicity and repellency to ant adults were determined. Insect repellency was observed with the midlle concentrations. The higher mortality occurred with the lowest concentration. The results revelead that EO of *M. cervina* has insecticidal activity against those two ant species.

Fungi surveys in *M. cervina* were done in October and November 2007, being identified 12 genera. The most predominant genera were *Alternaria* e *Fusarium*. These two genera and the species *Colletotrichum coccodes* and *Sclerotinia sclerotiorum* are potential plant pathogens of *Mentha* species.

Insect surveys were carried out in both aromatic plant species, weekly, between July, and November 2008. The dominant orders were Coleoptera and Hemiptera. Mites were also identified in *M. cervina*, comprising 4 families and four species.

Keywords: *Mentha pulegium* L., octopamine, pulegone, aromatic plants

EXTENDED ABSTRACT

Mentha L. is a genus of aromatic perennial herbs belonging to the family *Lamiaceae* distributed mostly in temperate and sub-temperate regions of the world. Different species of mint are used for their medicinal and aromatic properties, and cultivated for their essential oils and monoterpenes components of the oil, for use in food, flavour, cosmetic and pharmaceutical industries.

Pests and pathogens of *Mentha* may cause substantial damage to the crop and considerable loss in oil yield.

The concern about the negative effects caused by synthetic pesticides such environmental pollution, development of phenomena of resistance at treated insect populations and toxicity at different trophic levels led to a search for natural and environmentally friendly products. Plant extracts can be an alternative for a pest management with little harmfulness to environment.

The present study was aimed at the repellent/insecticidal properties of *Mentha cervina* L. essential oil (EO) against ants, the identification of the insects associated to *M. cervina* and *M. pulegium* L., and fungi associated to *M. cervina*.

The essential oils were obtained by hidrodestillation by using Clevenger apparatus of dried plant material. Two species of ants - *Tapinoma nigerrimum* Nylander and *Aphaenogaster senilis* Mayr - were used to study the repellent/insecticidal properties of *M. cervina* oil. The experimental unit corresponded to a system of two compartments separated by a PVC pipe containing a layer of filter paper dampened with EO solutions. Groups of 10 insects per replicate were placed in one of the compartments. The opposite compartment contained food. This allowed the insects to come into contact with the treated papers. Four concentrations were tested and each was replicated three times for *T. nigerrimum* and five times for *A. senilis*. EO was dissolved in ethanol and prepared with distilled water with different concentrations: 2,5; 5,0, 10,0 and 20,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Distilled water and 1% (v/v) ethanol (96%) were used as control. The effects on *T. nigerrimum* mortality were evaluated after 24 to 144 hours. Concentration OE 2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ provided 70% mortality after 72 hours. The effects on *A. senilis* were evaluated after 24 to 196 hours. Concentration OE 2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ provided 72% mortality after 192 hours. Percent mortality data were analysed by ANOVA (SPSS v. 15.0), Tukey's test was used to compare the difference between treatments.

The plant materials studied were collected from seedbeds located at the Botanic Park of Tapada da Ajuda at the Agronomic Institut of the Technical University of Lisbon. In order to deepen knowledge about insects associated to *M. cervina* and *M. pulegium*, samples were surveyed from 39 accessions of *M. cervina* and 3 accessions of *M. pulegium*, in July, September, October and November 2008, weekly. The specimens collected were preserved in 70% ethanol for identification. In all, 604 insects were identified comprising 4 different orders and 15 families. The higher number of insects found belongs to the orders Coleoptera and Hemiptera. Mites were identified in 12 accessions of *M. cervina*, comprising 4 families and four species.

In order to study the fungi associated to *M. cervina*, 30 accessions were selected. Samples were surveyed between October and November 2007, by visual observation of dried and/or necrotic plants. The surface sterilized roots and stems segments were evenly spaced in Petri dishes containing

potato dextrose agar (PDA) and potassium thiocyanate (KCNS 5%) medium. With the identification of the isolates, 12 genera were identified. The most predominant genera were *Alternaria* e *Fusarium*. These two genera and the species *Colletotrichum coccodes* and *Sclerotinia sclerotiorum* are cited in the literature as pathogenic to *Mentha* species.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	ii
ABSTRACT.....	iii
EXTENDED ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE QUADROS.....	x
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. <i>Mentha cervina</i> L. e <i>Mentha pulegium</i> L.	3
1.1. Caracterização botânica	3
1.1.1. A família <i>Lamiaceae</i>	3
1.1.1.1. O género <i>Mentha</i> L.	3
1.1.1.1.1. <i>Mentha cervina</i> L.	4
1.1.1.1.2. <i>Mentha pulegium</i> L.	4
2. Propriedades repelentes/insecticidas do óleos essenciais das plantas aromáticas.....	6
2.1. Actividade repelente/insecticida das plantas aromáticas mediterrânicas.....	6
2.1.1. Repelentes de insectos	6
2.1.2. Características do neurotransmissor octopamina	7
3. Problemas inerentes à comercialização de biopesticidas de origem vegetal.....	13
4. As formigas e o efeito da octopamina.....	14
5. Pragas que afectam o género <i>Mentha</i> L.	17
5.1. Artrópodes	18
5.1.1. Pragas do solo	18
5.1.2. Pragas foliares	23
5.1.3. Outras pragas	25
5.2. Moluscos	25
6. Doenças que afectam o género <i>Mentha</i> L.	26
6.1. Verticilose	26
6.2. Ferrugem	26
6.3. Oídio	26
6.4. Podridão do caule e das raízes	27
6.5. Cancro dos caules	27
6.6. Alternariose	27
III. MATERIAL E MÉTODOS	28
1. Material vegetal	28
2. Propriedades repelentes/insecticidas do óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> L.	30
2.1. Extracção do óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> L.	30
2.2. Soluções do óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> L.	31

2.3. Obtenção das formigas	31
2.4. Ensaio biológicos	32
2.5. Análise estatística e tratamento de dados	33
3. Insectos associados a <i>Mentha cervina</i> L.....	33
3.1. Captura, preparação e conservação dos exemplares	33
4. Fungos associados a <i>Mentha cervina</i> L.	34
4.1. Observação de sintomas e colheita do material vegetal	35
4.2. Estudos laboratoriais das amostras	35
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
1. Propriedades repelentes/insecticidas do óleo essencial em formigas.....	36
1.2. Composição do óleo essencial	36
1.3. Ensaio	36
1.3.1. <i>Tapinoma nigerrimum</i> Nylander	36
1.3.2. <i>Aphaenogaster senilis</i> Mayr	43
1.3.3. Discussão global	48
2. Insectos associados a <i>Mentha cervina</i> L.	51
3. Fungos associados a <i>Mentha cervina</i> L.....	60
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS.....	75
Anexo A - Análise de Variância.....	76
A1 – Análise de variância relativamente a <i>Tapinoma nigerrimum</i> Nylander	76
A2 – Análise de variância relativamente a <i>Aphaenogaster senilis</i> Mayr.....	81
Anexo B.....	88
Quadro B1 – Distribuição dos artrópodes associados a plantas de género <i>Mentha</i> L. nos países da Europa e respectivas regiões autónomas, elaborado com base em Fauna Europaea Web Service (2004)	88
Anexo C.....	91
Quadro C1 – Fungos isolados nas populações de <i>Mentha cervina</i> L.	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 - a) <i>Mentha cervina</i> L. no início do ciclo; b) <i>Mentha cervina</i> L. no final do ciclo evidenciando o engrossamento do caule (originais da autora)	4
Fig. 2 - a) <i>Mentha pulegium</i> L. no início do ciclo; b) <i>Mentha pulegium</i> L. na floração, c) Inflorescências de <i>Mentha pulegium</i> L. (originais da autora)	5
Fig. 3 – Canteiros onde foram plantadas as populações de <i>Mentha cervina</i> L. e de <i>Mentha pulegium</i> L., aspecto geral do canteiro e pormenor do sistema de rega gota-a-gota (original da autora).....	30
Fig. 4 - Representação esquemática do aparelho de Clevenger modificado (original da autora)	31
Fig. 5 - Armadilhas utilizadas para capturar formigas (originais da autora)	32
Fig. 6 – Dispositivo experimental utilizado nos ensaios (original da autora)	32
Fig. 7 – Diferentes tipos de sintomas observados em <i>Mentha cervina</i> L. : a) Caule de MC2 evidenciando necroses a nível dos entrenós; b) Sistema radicular de MC3 evidenciando presença de micélio; c) Rizoma de MC5 evidenciando cor avermelhada e fendas longitudinais; d) Sistema radicular de MC5 evidenciando presença de micélio (originais da autora)	35
Fig. 8 – Taxa de mortalidade (%) (\pm erro padrão) ocorrida ao longo de 144 horas em todas as modalidades, no ensaio realizado com <i>Tapinoma nigerrimum</i> Nylander	38
Fig. 9 – Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE ₂₀ ao longo de 144 h no ensaio realizado com <i>Tapinoma nigerrimum</i> Nylander	39
Fig. 10 - Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE ₁₀ ao longo de 144 h no ensaio realizado com <i>Tapinoma nigerrimum</i> Nylander	40
Fig. 11 - Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE ₅ ao longo de 144 h no ensaio realizado com <i>Tapinoma nigerrimum</i> Nylander	41
Fig. 12 - Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE _{2,5} ao longo de 144 h no ensaio realizado com <i>Tapinoma nigerrimum</i> Nylander	42
Fig. 13 - Concentração de formigas da espécie <i>Tapinoma nigerrimum</i> Nylander no compartimento de partida (original da autora)	42
Fig. 14 - Taxa de mortalidade (%) (\pm erro padrão) ocorrida ao longo de 192 horas em todas as modalidades no ensaio realizado com <i>Aphaenogaster senilis</i> Mayr	44
Fig. 15 - Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE ₂₀ ao longo de 192 h no ensaio realizado com <i>Aphaenogaster senilis</i> Mayr	45
Fig. 16 - Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE ₁₀ ao longo de 192 h no ensaio realizado com <i>Aphaenogaster senilis</i> Mayr	46
Fig. 17 - Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE ₅ ao longo de 192 h no ensaio realizado com <i>Aphaenogaster senilis</i> Mayr	47
Fig. 18 - Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE _{2,5} ao longo de 192 h no ensaio realizado com <i>Aphaenogaster senilis</i> Mayr	47
Fig. 19 – a) concentração de formigas da espécie <i>Aphaenogaster senilis</i> Mayr no compartimento de partida em OE ₅ (72 horas); b) formigas a retirarem o papel de filtro do interior do tubo na modalidade	

OE ₅ ; C): formigas a atravessarem o tubo na modalidade OE _{2,5} ; d): dispositivo experimental (originais da autora)	48
Fig. 20 – Percentagem de insectos capturados distribuídos pelas respectivas ordens	54
Fig. 21 – Estragos observados em <i>Mentha cervina</i> L. (MC) e <i>Mentha pulegium</i> L. (MP) provocados por insectos: a) Folhas roídas (MC); b) caule e folhas roídas (a rosa) e necrose das folhas (a azul) (MC); c) plantas com cloroses (MC); d) Folhas roídas e com necroses (MP) (originais da autora).....	55
Fig. 22 – Gafanhoto adulto (original da autora)	55
Fig. 23 - Insectos identificados no presente estudo. Coleoptera: a) SP1; b) SP2; c) SP3; d) SP4; e) SP5; f) SP6; Hemiptera: g) SP7; h) SP8; i) SP9; j) SP10 (originais da autora)	56
Fig. 24 - Insectos identificados no presente estudo. Hemiptera: a) SP11; b) SP12; c) SP13; d) SP14; e) SP15; f) SP16; Diptera: g), SP17; h) SP18; i) SP19; j) SP20; k); Hymenoptera: SP21: l) SP22: m) SP23) (originais da autora)	57
Fig. 25 - Folhas e caules de <i>Mentha cervina</i> L. com avermelhamento (original da autora)	60
Fig. 26 – Aspecto dos canteiros de <i>Mentha cervina</i> L.: a) MC1; b) MC2; c) MC3; d) MC4 (originais da autora)	61
Fig. 27 – Aspecto dos canteiros de <i>Mentha cervina</i> L.: a) MC5; b) MC7; c) MC9; d) MC10 (originais da autora)	62
Fig. 28 – Aspecto dos canteiros de <i>Mentha cervina</i> L.: a) MC13; b) MC15; c) MC16; d) MC18 (originais da autora)	62
Fig. 29 - Aspecto dos canteiros de <i>Mentha cervina</i> L.: a) MC19; b) MC21; c) MC22; d) MC23 (originais da autora)	63
Fig. 30 – Fungos identificados nas populações de <i>Mentha cervina</i> L.	64

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Identificação dos locais de origem das populações de <i>Mentha cervina</i> L. e <i>Mentha pulegium</i> L. em cultura no Parque Botânico da Tapada da Ajuda do Instituto Superior de Agronomia, Lisboa (Adaptado de Póvoa 2008)	28
Quadro 2 – Concentrações de óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> L. utilizadas nos ensaios ...	31
Quadro 3 - Identificação das populações estudadas de <i>Mentha cervina</i> L. e respectivos estádios de desenvolvimento	34
Quadro 4 - Composição (%) do óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> L. utilizado no ensaio relativo à toxicidade/repelência em formigas. v: vestigial (<0,05%), (RI - Índice de Retenção)	37
Quadro 5 – Insectos identificados, populações onde foram capturados/observados, órgãos onde foram observados (1 = Caules; 2 = Folhas; 3 = Inflorescências; (+) = maior incidência) e número de exemplares capturados	52
Quadro 6 – Ácaros identificados em <i>M. cervina</i> L.	54
Quadro 7 – Percentagem de plantas de <i>Mentha cervina</i> secas ou com necroses	60
Quadro 8 - Presença (S) ou ausência (N) de plantas secas ou com necroses de diferentes populações de <i>Mentha cervina</i> L. nos canteiros	61
Quadro 9 – Fungos presentes por população e por órgão vegetal de <i>Mentha cervina</i> L. (C – caule, R – raiz)	65

I. Introdução

Diversas espécies pertencentes ao género *Mentha* L. são consideradas culturas industriais, pois constituem uma fonte de óleos essenciais ricos em monoterpenos muito utilizados nas indústrias de produtos alimentares, cosméticos e produtos farmacêuticos. A cultura de *Mentha* spp. é importante em países como os E.U.A., França, Reino Unido, Itália, Jugoslávia, Hungria, Bulgária, Rússia, África do Sul, Tailândia, Vietname, China, Taiwan, Índia, Japão e Brasil. Todavia, as diversas espécies são susceptíveis ao ataque de diversas pragas e doenças que causam estragos substanciais nas plantas e perdas consideráveis na produção de óleos essenciais (Bhat *et al.*, 2002).

Actualmente, existe um interesse considerável no desenvolvimento de produtos alternativos aos pesticidas sintéticos não-selectivos para o controlo de pragas e doenças com importância económica. As propriedades físico-químicas e estruturais dos extractos de plantas ou compostos voláteis pode influenciar o comportamento alimentar de insectos, nemátodes, lesmas, fungos e bactérias. Muitas plantas contêm compostos voláteis que poderão ser detectados à distância e actuar como atractivos ou repelentes de determinados seres vivos e que potencialmente poderão constituir pragas das plantas. Actualmente, existe grande interesse em estudar e identificar compostos que possam vir a ser utilizados na protecção de plantas (Traboulsi *et al.*, 2002).

Determinados óleos essenciais, ou os seus constituintes principais, possuem propriedades repulsivas ou tóxicas para os insectos (Regnault-Roger *et al.*, 1993). Segundo Isman (2002), estudos recentes revelaram que a maior parte dos compostos constituintes dos óleos essenciais são neurotoxinas que interferem com o neurotransmissor octopamina, que existe nos artrópodes.

As plantas aromáticas que manifestam actividade insecticida pertencem a várias famílias, tais como *Myrtaceae*, *Poaceae*, *Umbelliferae*, *Lauraceae*, *Myristicaceae* e *Lamiaceae*, sendo esta última a que evidencia maior actividade insecticida, para além de um elevado teor de óleos essenciais (Regnault-Roger, 2002).

A hortelã-da-ribeira (*Mentha cervina* L.), também conhecida por poejo-fino e erva-peixeira e o poejo (*Mentha pulegium* L.) pertencem à família *Lamiaceae* (Labiadas) e têm uma longa história como ervas aromáticas e plantas medicinais na etnografia portuguesa (Monteiro *et al.*, 2008). Estas plantas, fortemente aromáticas, contêm óleos essenciais ricos em componentes que possuem características antioxidantes, antibacterianas e antifúngicas, dos quais se destacam a pulegona, a mentona e a isomentona, mas também a piperitona (Monteiro *et al.*, 2008). São ervas vivazes (raramente anuais), estolhosas, com folhagem aromática (Franco, 1984), distribuídas na sua maioria nas regiões temperadas e sub-temperadas (Agnihotri *et al.*, 2005). As duas espécies são repelentes de moscas, formigas, traças e pulgas, razão pela qual têm sido estudadas as suas propriedades insecticidas (Franzios *et al.*, 1997).

Em síntese, o presente trabalho teve como objectivos principais:

- 1) O estudo das propriedades repelentes/insecticidas do óleo essencial de *M. cervina* em duas espécies de formigas *Tapinoma nigerrimum* Nylander e *Aphaenogaster senilis* Mayr;
- 2) o levantamento e identificação de insectos associados a diversas populações de *M. cervina* em cultura;

- 3) e, a identificação de fungos associados a diversas populações de *M. cervina*, também em cultura.

Tendo em consideração o que foi dito anteriormente, este trabalho foi estruturado em cinco capítulos principais. Em primeiro lugar, é apresentada uma breve contextualização do tema, à qual se segue o capítulo referente à revisão bibliográfica. Este capítulo foi subdividido em seis sub-capítulos. O primeiro caracteriza o material vegetal. No segundo sub-capítulo, referente às propriedades repelentes/insecticidas dos óleos essenciais de plantas aromáticas, é feita uma abordagem à actividade repelente/insecticida das plantas aromáticas mediterrânicas, aos repelentes de insectos e ao neurotransmissor octopamina. No terceiro subcapítulo é feita uma abordagem à problemática inerente à comercialização de biopesticidas de origem vegetal. O quarto sub-capítulo é referente às formigas e ao efeito da octopamina. No quinto e sexto sub-capítulos é apresentado um levantamento dos artrópodes e moluscos referenciados como pragas e das doenças que afectam o género *Mentha* L., nos E.U.A., respectivamente.

O capítulo correspondente ao material e métodos foi subdividido em quatro sub-capítulos. Em primeiro lugar é feita uma caracterização do material vegetal utilizado. Seguidamente são descritas as metodologias utilizadas no estudo das propriedades repelentes/insecticidas do óleo essencial de *M. cervina*, no estudo dos insectos associados a *M. cervina* e no estudo dos fungos associados a *M. cervina*.

O capítulo dos resultados e discussão foi dividido em três sub-capítulos, em primeiro lugar são apresentados os resultados do estudo das propriedades repelentes/insecticidas do óleo essencial de *M. cervina*, seguidamente os resultados obtidos no estudo dos insectos associados a *M. cervina*, e finalmente os resultados relativos aos fungos associados a *M. cervina*.

No último capítulo são apresentadas algumas considerações finais que correspondem à conclusão do trabalho.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Mentha cervina* L. e *Mentha pulegium* L.

1.1. Caracterização botânica

1.1.1. A família *Lamiaceae*

As plantas pertencentes à família *Lamiaceae* são ervas ou arbustos, normalmente glandulosos e aromáticos (Franco, 1984). Segundo este autor, o dimorfismo sexual ocorre em vários géneros, com flores femininas que são normalmente menores, ocorrendo com usuais flores hermafroditas na mesma ou em diferentes plantas.

Segundo Mulas (2006), a família *Lamiaceae* é particularmente rica em biodiversidade e tem sido utilizada com diversas finalidades desde a Antiguidade. De acordo com este autor, encontram-se documentadas diversas utilizações tradicionais que incluem: alimentação humana e animal, utilização devida às propriedades aromáticas, medicinais e veterinárias, produção de licor, combate a pragas e parasitas, cosméticos, decoração, combustível e iluminação, artesanato, tratamento de peles e tecidos, e rituais de magia.

De acordo com Morris (2006), muitas das espécies pertencentes à família *Lamiaceae* são cultivadas para fins comerciais, tendo em vista a obtenção de óleos essenciais.

1.1.1.1. O género *Mentha* L.

As plantas pertencentes ao género *Mentha* L. são ervas vivazes (raramente anuais), estolhosas, com folhagem aromática (Franco, 1984; Tutin *et al.*, 1972), distribuídas na sua maioria nas regiões temperadas e sub-temperadas (Agnihotri *et al.*, 2005). De acordo com Gianessi (2009), este género tem origem mediterrânica. Flores hermafroditas ou femininas, na mesma ou em diferentes plantas, geralmente com densos verticilastros multifloros, por vezes, constituindo uma longa inflorescência espiciforme ou um capítulo terminal. Cálice actinomórfico ou francamente 2-labiado, tubuloso ou campanulado, 10- a 13-nérveo, com 5(4) dentes subiguais ou raramente desiguais. Corola francamente 2-labiada, com 4 lobos subiguais, o lobo superior mais largo e geralmente emarginado; tubo menor que o cálice. Estames 4, subiguais, divergentes ou ascendentes sob o lábio superior da corola, exsertos (excepto nalguns híbridos e nas flores femininas); anteras com lóculos paralelos. Ramos do estilete subiguais. Mericarpos lisos, reticulados ou granulados.

Este género é taxonomicamente complexo, pois devido à grande plasticidade fenotípica e variabilidade genética, muitas das espécies são interférteis, o que dificulta a identificação (Franco, 1984; Xavier *et al.*, 2006; Fialová *et al.*, 2008). É frequente a existência de híbridos na natureza, estes podem ser reconhecidos pelo aspecto intermédio e esterilidade, embora por vezes ocorram populações de híbridos férteis (Tutin *et al.*, 1972; Franco, 1984).

1.1.1.1.1. *Mentha cervina* L.

De acordo com Tutin *et al.* (1972) e Franco (1984), a espécie *M. cervina* é um proto-hemicriptófito de 10-40 cm, de caules prostrados e radicantes inferiormente, erectos acima. Possui folhas com 10-25 x 1-4 mm, linearmente oblanceoladas, atenuadas na base, sésseis, glabras, inteiras ou sinuado-dentadas; brácteas mais largas que as folhas; cálice com 2-3 mm, de dentes triangulares prolongados num espinho esbranquiçado; corola com 5-6 mm, lilacínea ou branca; mericarpos ovóide-oblongos, lisos (Fig. 1).

Segundo Monteiro *et al.* (2008), esta espécie ocorre em sítios húmidos e pantanosos. Em Portugal, inicia o seu desenvolvimento na Primavera, floresce durante o Verão e, completa o seu ciclo de vida em sete meses.

A hortelã-da-ribeira é uma espécie espontânea na parte Oeste da região Mediterrânea, que inclui a Península Ibérica, o Sul de França, Marrocos e Argélia (Valdés *et al.*, 1987).

De acordo com Monteiro (2006), a pulegona atinge a sua maior concentração em plena floração (Junho-Julho).



Fig. 1 - a) *Mentha cervina* L. no início do ciclo; b) *Mentha cervina* L. no final do ciclo evidenciando o engrossamento do caule (originais da autora).

1.1.1.1.2. *Mentha pulegium* L.

Segundo Tutin *et al.* (1972) e Franco (1984), a espécie *M. pulegium* é um protohemicriptófito com 10-40 cm, subglabro a tomentoso, fortemente aromático, de caules prostrados a ascendentes. Possui folhas com 8-30 x 4-12 mm, elíptico-oblongas, atenuadas na base, raramente suborbiculares, curtamente pecioladas, inteiras ou com até 6 pares de dentes, pilosas pelo menos na página abaxial; cálices com (2-)2, 5-3 mm, de dentes ciliados, os inferiores assovelados, os superiores menores e mais largos; corola com (4-)4, 5-6 mm, lilacínea; estames exsertos ou inclusos, as anteras férteis com 0,4 mm; mericarpos com 0,75 mm, acastanhados (Fig. 2).

O poejo ocorre em lugares húmidos ou inundados de Inverno, valas e linhas de água, sendo ainda abundante e frequente no país. Em Portugal encontra-se em floração de Junho a Outubro (Monteiro *et al.*, 2008).

De acordo com Monteiro *et al.* (2008), os óleos essenciais são produzidos nos tricomas glandulares que fazem parte do denso indumento que cobre os órgãos aéreos, vegetativos e reprodutivos. Segundo Monteiro (2006), a pulegona atinge a sua maior concentração em plena floração (Junho-Julho).

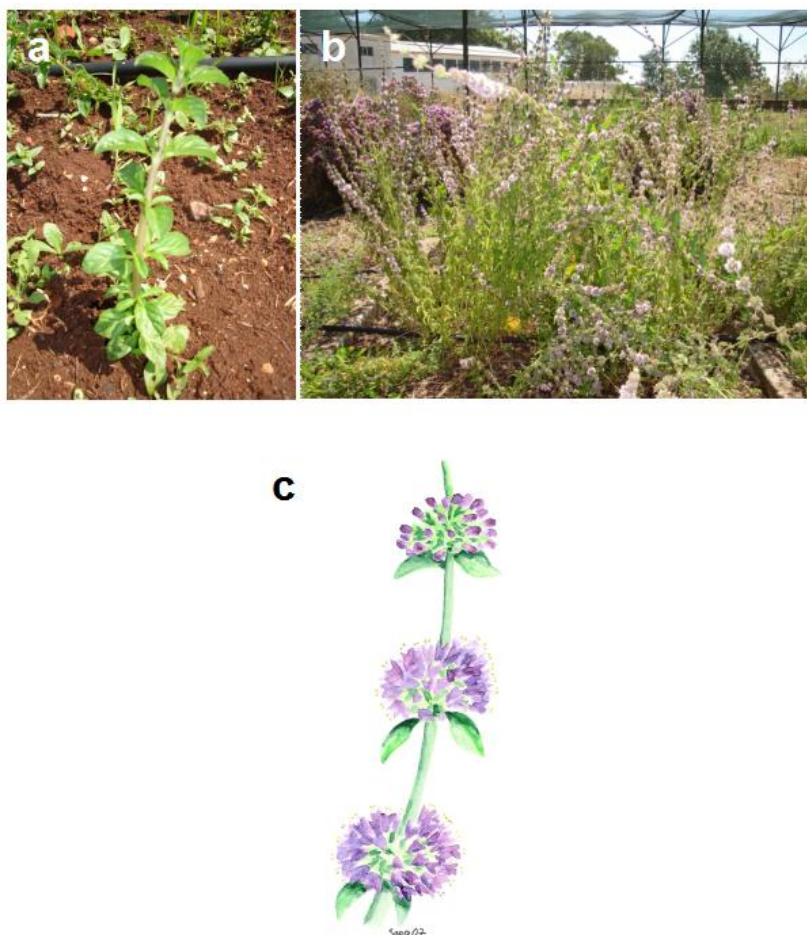


Fig. 2 - a) *Mentha pulegium* L. no início do ciclo: b) *Mentha pulegium* L. na floração, c) Inflorescências de *Mentha pulegium* L. (originais da autora).

2. Propriedades repelentes/insecticidas dos óleos essenciais das plantas aromáticas

2.1. Actividade repelente/insecticida das plantas aromáticas mediterrânicas

Nos anos 90, Regnault-Roger e Hamraoui estudaram a actividade dos óleos essenciais de plantas aromáticas mediterrânicas e monoterpenos em *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae), verificando a ocorrência de toxicidade inalatória nos insectos adultos, actividade larvicida e ovicida, para além da inibição da alimentação em larvas. Estes autores verificaram também que os machos são mais sensíveis do que as fêmeas, mas a reprodução é igualmente afectada em ambos os sexos. Alguns óleos essenciais actuam precocemente nas primeiras etapas do ciclo reprodutivo, enquanto outros actuam nos últimos estádios, o que indica que as plantas aromáticas exercem uma dupla actividade sobre os insectos, através da acção tóxica do tipo inalatório em adultos e nas diferentes fases do ciclo reprodutivo (inibição da fecundidade, que se traduz na diminuição da taxa de reprodução dos sobreviventes, actividade ovicida e larvicida).

Os óleos essenciais são obtidos através da hidrodestilação de material vegetal e geralmente consistem numa mistura complexa de monoterpenóides, sesquiterpenóides e fenóis, que conferem às plantas sabor e aroma característicos (Isman 2002). Regnault-Roger *et al.* (1993), verificaram que determinados óleos essenciais, ou os seus constituintes principais, possuem propriedades repulsivas ou tóxicas para os insectos. Mais recentemente, foi demonstrado que numerosos constituintes terpenóides dos óleos essenciais são tóxicos por contacto para um vasto leque de insectos e podem ser utilizados como insecticidas de origem vegetal, tal como foi referido por Isman (2002). Dentro destes compostos, aqueles que apresentam maior eficácia são o timol, extraído de *Thymus vulgaris*, a pulegona, extraída de *M. pulegium* (família *Lamiaceae*) e o eugenol, extraído de *Eugenia cariophyllus* (Spreng.) Bullock & S. G. Harrison (família *Myrtaceae*). Aquele autor refere ainda que aqueles compostos são neurotoxinas que interferem com o neurotransmissor octopamina, que existe nos artrópodes. Esta particularidade explica a tolerância relativa dos mamíferos a estes compostos, que se encontram disponíveis para utilização comercial em diversos produtos, como perfumes e aromatizantes.

2.1.1. Repelentes de insectos

Os compostos repelentes de insectos têm vindo a ser utilizados desde a antiguidade, quando diversos óleos de plantas, fumos, alcatrão, etc., eram usados para repelir ou matar insectos. Os repelentes de insectos são uma alternativa ao uso de insecticidas. Podem ser utilizados de diversas formas, desde a aplicação na pele, para prevenir as picadas de insectos e outros artrópodes, até à exclusão de insectos de determinadas áreas, como, por exemplo, nos armazéns de sementes, a fim de evitar infestações (Peterson & Coats 2001).

Os compostos de defesa das plantas que previnem ou reduzem o contacto entre os insectos e o substrato são conhecidos como repelentes. Uma elevada concentração de monoterpenos nas plantas actua como repelente para potenciais predadores (Panda & Khush 1995).

Peterson & Coats (2001), descrevem o comportamento evidenciado devido ao efeito da repelência como resultado de diversos eventos fisiológicos ou bioquímicos. Os ácidos oleico e linolénico são referidos como compostos envolvidos nas reacções que estão na base da capacidade de reconhecimento e aversão à morte (repelência) em baratas, tendo sido proposto o termo “necromona” para descrever o composto responsável por este tipo de comportamento. Ainda não foi esclarecido se os repelentes actuam através de mecanismos comuns em diferentes artrópodes, sendo possível encontrar resultados contraditórios na literatura (Peterson & Coats, 2001). As diferenças na sensibilidade aos repelentes em diferentes classes, ordens e famílias são apenas em termos de grau, não foram observadas diferenças fundamentais no tipo de resposta (Rutledge *et al.*, 1997). A volatilidade é vista por muitos como sendo essencial à actividade repelente, pois um composto que irrita as patas de um insecto irá causar uma redução do seu tempo de permanência na área tratada (Peterson & Coats, 2001).

As relações estrutura-actividade dos repelentes ainda não estão esclarecidas, e ainda foi feito pouco trabalho definitivo acerca deste assunto. No entanto, Davis (1985) menciona a existência de outras fontes que indicam que o grupo funcional de oxigénio é necessário à actividade (Peterson & Coats, 2001).

2.1.2. Características do neurotransmissor octopamina

De acordo com Roeder (1995), a octopamina (OA) foi descoberta e identificada nas glândulas salivares de um polvo (*Octopus vulgaris* Cuvier, Octopoda: Octopodidae) em 1951, por Erspamer e Boretti. O seu significado biológico neste animal ainda não foi compreendido. Em termos bioquímicos, é uma monoamina biogénica também conhecida por p-hidroxietanolamina. Degen *et al.* (2000), baseados em Hoyle (1986), Sombati & Hoyle (1984 a, b), Bacon *et al.* (1995), Roeder *et al.* (1998), afirmam que a importância da octopamina é devida ao papel relevante que desempenha no controlo do comportamento e na regulação do estado motivacional dos invertebrados.

São conhecidos nos insectos numerosos efeitos da octopamina em alvos periféricos, como os músculos e também a nível do sistema nervoso central (Degen *et al.*, 2000). Segundo estes autores, o estudo dos alvos periféricos é mais acessível em termos de manipulação experimental relativamente ao estudo dos efeitos a nível do sistema nervoso central, pois a dissecação de tecidos permite determinar a quantidade de octopamina nos órgãos dos insectos.

Enan (2005), citando Orchard (1982) e Hollingworth *et al.* (1984), afirma que a octopamina se encontra em grandes proporções no sistema nervoso dos artrópodes, apresentando um largo espectro de papéis biológicos nos insectos, através da sua acção como neurotransmissor, neurohormona e neuromodulador. Degen *et al.* (2000) referem ainda que, de acordo com Sombaty & Hoyle (1984 b), Mulloney *et al.* (1987), Kyriakides & McCrohan (1989), a iniciação e manutenção de comportamentos rítmicos nos invertebrados, tais como o voo e a locomoção nos insectos, a natação

nos crustáceos e a mastigação nos moluscos foi atribuída ao efeito da octopamina, mas os efeitos deste composto estendem-se a comportamentos mais complexos, como é o caso da memória e da aprendizagem (Dudai *et al.*, 1987; Menzel *et al.*, 1988; Hammer, 1993; Hammer & Menzel, 1998).

Síntese de octopamina

A octopamina (OA) e o seu precursor tiramina (TA), são produtos resultantes do aminoácido tirosina. Segundo Roeder *et al.* (2003), a tiramina resulta da descarboxilação da tirosina pela enzima tirosina-decarboxilase, e constitui o substrato da enzima tiramina- β -hidroxilase (T β H). Esta enzima tem a capacidade de converter a tiramina em octopamina através da adição de um grupo hidroxil na posição β e encontra-se em todos os neurónios e células que sintetizam octopamina.

Modo de acção da octopamina a nível das respostas fisiológicas dos insectos

A octopamina encontra-se presente numa pequena fracção dos neurónios do cérebro dos insectos (variável entre os insectos de maiores e menores dimensões). Ao serem libertadas na sinapse, a octopamina e a tiramina vão ligar-se aos correspondentes receptores para despoletar uma resposta fisiológica. Esta acção termina após um curto período, para activar os sinais que vão actuar nas células pós-sinápticas. Uma fase designada por reabsorção seguida da inactivação enzimática marcam o final do processo (Roeder *et al.*, 2003).

Características gerais dos receptores de octopamina (OARs)

Para além do significado biológico em invertebrados, os receptores OA (ou OARs) apresentam interesse adicional, pois a octopamina é, em conjunto com o seu precursor tiramina, o único transmissor não peptídico cujo papel se restringe aos invertebrados.

Segundo Roeder (1991), são conhecidas quatro classes de receptores ligados a membranas com os quais a octopamina interage, pertencentes à família das GPCRs (receptores emparelhados de proteínas-G), tendo sido reconhecido o receptor neuronal de classe 3 como principal alvo dos insecticidas. Uma das características da activação das GPCRs é a alteração das concentrações intracelulares dos mensageiros cAMP (AMP cíclico) e Ca²⁺ (Blenau & Baumann, 2001). Segundo estes autores, a alteração da concentração de cAMP e de Ca²⁺ ocorre em função do tipo de GPCR activado, sendo estas as respostas celulares mais comuns aos tratamentos com aminas biogénicas. Este tipo de resposta é utilizado na classificação de subtipos de OARs. Existe alguma homologia entre o sistema adrenogénico dos vertebrados e o sistema octopaminogénico dos invertebrados devido a similaridades em termos fisiológicos, contudo, o perfil farmacológico de ambos os sistemas é bastante diferente. Este facto é de grande importância, na medida em que a actividade insecticida de diversos produtos é desenvolvida através da interacção com os receptores de octopamina.

Influência dos receptores (OARs) na actividade da octopamina

As acções da OA e da TA são mediadas por receptores emparelhados de proteínas-G, tal como já foi referido. Nas décadas de 70 e 80, foram analisados vários aspectos da neurotransmissão ligada à OA. Roeder *et al.* (2003) afirmam que, de acordo com Evans (1981), Roeder (1990, 1992, 1994), Roeder & Gewecke (1990), a OA actua através de quatro receptores que podem ser identificados pelas suas propriedades farmacológicas. Segundo Han *et al.* (1998), o primeiro receptor de OA verdadeiro foi clonado a partir de uma espécie de *Drosophila* no laboratório Ronald Davis e foi denominado OAMB, devido à predominância nos centros de aprendizagem e memória, designados por *corpora pedunculata* (na língua inglesa designados por *mushroom bodies*), que consistem num par de estruturas localizadas no cérebro dos insectos e de outros artrópodes, e mais tarde, verificou-se que também existe em concentrações elevadas nos lobos ópticos.

Roeder *et al.* (2003), citando Saudou *et al.* (1990), afirmam que a presença de receptores de tiramina (TAR) nos insectos foi considerada desde a descoberta da maior afinidade da TA relativamente à OA para um determinado receptor em *Drosophila*. Estudos efectuados por diversos autores levaram a concluir que apenas um OAR “clássico” se encontra presente nos insectos, embora possa apresentar variantes.

São conhecidas centenas de compostos que apresentam elevada afinidade para os receptores de OA. Segundo Roeder *et al.* (2003), os compostos maioritários são agonistas, sendo os restantes antagonistas. Os agonistas são compostos cuja estrutura é muito semelhante à da OA, e que apresentam grande afinidade para os OARs, actuando através da competição para a formação de ligações. Os primeiros agonistas estudados foram as formamidinas, que apresentam elevado potencial insecticida, mas o mesmo efeito pode ser obtido com amitraz, por exemplo (Roeder *et al.*, 2003).

Não existe muita informação acerca dos antagonistas, mas a actuação através do bloqueio específico (ou inibição) da acção da OA é um facto conhecido. A fentolamina é um exemplo de composto pertencente a este grupo. A maioria destes compostos tem a desvantagem de apresentar um baixo grau de especificidade. Segundo Roeder *et al.* (2003), o único antagonista que apresenta a capacidade de fazer ligações de elevada afinidade com os OARs e consequentemente, bloquear a neurotransmissão octopaminogénica é a epinastina, que apresenta um espectro de acção relativamente elevado para os vertebrados.

As características do receptor neuronal da OA podem ser partilhadas por receptores homólogos de espécies distanciadas, como os OARs dos gafanhotos (ortópteros hemimetabólicos) e abelhas melíferas (himenópteros holometabólicos), cujo último ancestral comum viveu há mais de 300 milhões de anos. De acordo com Degen *et al.* (2000), este facto permite construir um modelo de receptor que pode englobar a maioria das espécies de insectos.

Influência da octopamina e da tiramina na fisiologia dos insectos

Segundo Roeder *et al.* (2003), o conhecimento acerca do significado fisiológico da octopamina e da tiramina nos insectos é tão reduzido como o que existe acerca dos receptores. Uma linha mutante de *Drosophila*, designada por *honoka*, evidencia reduzida concentração de receptores deste composto. Comparativamente ao tipo selvagem, esta linha mutante apresenta ligeiras diferenças fenotípicas, é ligeiramente hiperactiva e apresenta falhas nalgumas tarefas dependentes do olfacto para além da baixa contracção muscular induzida pela tiramina. De acordo com estes autores, a actividade moduladora da octopamina ainda não está bem esclarecida no respeito ao tipo de órgãos afectados, embora o seu efeito tenha sido verificado em quase todos os órgãos sensoriais dos insectos, como por exemplo, a adaptação da visão diurna para nocturna em alguns lepidópteros. A maioria dos efeitos produzidos foi observada em tecidos periféricos e demonstrou-se que estes são necessários à adaptação do desempenho motor para determinadas exigências fisiológicas. Os tecidos estudados fazem parte dos músculos e incluem os músculos esqueléticos, os músculos de voo, dos ovários e os elementos contrácteis do coração. Enan (2005), baseando-se em Enan (1998, 2001) e em Abou-Ela & Enan (2001), refere que foram efectuados outros estudos em *Periplaneta americana* Linnaeus (Dictyoptera: Blattidae) que demonstraram que os óleos essenciais de plantas aromáticas provocam a produção de AMP cíclico no sistema nervoso e afectam o ritmo cardíaco destes insectos. A octopamina produz efeito sobre outros órgãos como a traqueia e o corpo adiposo. Este órgão é constituído por um conjunto de massas de coloração clara e que revestem os órgãos internos, apresentando uma grande superfície de contacto com a hemolinfa. Esta organização, que permite a troca de diversas substâncias e a acumulação de substâncias alimentares no final de períodos de intensa alimentação. A influência da octopamina sobre o corpo adiposo faz parte do aspecto geral da acção deste composto em alturas de stress ou elevada necessidade energética. Elevados níveis de OA na hemolinfa despoletam uma reacção nos insectos que lhes permite voar ou lutar (Roeder *et al.*, 2003). Estudos efectuados em gafanhotos das espécies *Locusta migratoria* Linnaeus (Orthoptera: Acrididae) e *Schistocerca gregaria* Forsskål (Orthoptera: Acrididae), demonstraram que elevados níveis de OA afectam o estado energético dos insectos, ocorrendo duas fases. Na primeira fase ocorre a libertação de hormonas adipocinéticas (AKH) a partir do *corpora cardiaca* (corpos de pequenas dimensões situados junto à aorta). Na segunda fase, a OA actua directamente sobre o corpo adiposo, que procede à libertação de ácidos gordos na hemolinfa, cujo efeito é sinérgico em relação ao efeito da hormona adipocinética. De acordo com Malamud *et al.* (1988), esta acção da OA permite que os insectos possam passar de uma fase de repouso para uma actividade cujas necessidades energéticas sejam bastante elevadas, tal como o voo durante longos períodos de tempo.

Milde *et al.* (1995) afirmam que, segundo Gäde (1990), as hormonas adipocinéticas (AKHs) ocorrem em larga escala nos insectos. Orchard (1987), atribui a estas hormonas a capacidade de regular a libertação de energia acumulada. De acordo com Ziegler *et al.* (1990) e Goldsworthy (1983), nos gafanhotos e nos lepidópteros, as hormonas adipocinéticas são produzidas pelas células neurosecretoras intrínsecas dos *corpora cardiaca* e libertadas no sistema circulatório para mobilizar

os lípidos do corpo adiposo para o voo. Diversas funções têm vindo a ser atribuídas aos péptidos pertencentes à família AKH, tais como a aceleração do ritmo cardíaco da barata *P. americana* (Baumann & Gersh, 1982), estímulo da síntese de citocromo em *Blaberus discoidalis* Audinet-Serville (Dictyoptera: Blaberidae) (Keeley, 1978) e a inibição da síntese de proteínas em grilos (*Cusinato et al.*, 1991).

Roeder *et al.* (2003) referem que um estudo efectuado por Nathanson (1979) permitiu a observação directa da actuação da OA no órgão produtor de luz dos pirilampos (Coleoptera: Lampyridae). Estes insectos possuem a capacidade de emitir luz (quimicamente), sem produzir calor. Esta luz funciona como atractivo entre machos e fêmeas. A produção de luminosidade ocorre quando uma substância designada por luciferina é oxidada numa reacção catalisada pela enzima luciferase (enzima). Este fenómeno é designado por bioluminescência e é característico também de alguns moluscos. A duração da emissão de luz é característica de cada espécie, e é controlada por um vasto conjunto de nervos do órgão produtor de luz. A OA libertada dos neurónios desemparelhados localizados no gânglio abdominal conduz à emissão de luminosidade, através do estímulo do órgão. Este efeito pode ser conseguido também através de estimulação eléctrica. O interesse deste estudo reside no facto destas reacções poderem ser facilmente mensuráveis. Mais tarde, em 1984, Sombati e Hoyle foram os pioneiros da caracterização das funções da OA adoptando o gafanhoto como organismo modelo. Através da injeção do composto OA no gânglio abdominal de fêmeas de gafanhoto, conseguiram despoletar movimentos de escavação, que fazem parte do procedimento de postura. A experiência estendeu-se a diferentes partes do sistema nervoso dos insectos e, dependendo do ponto de aplicação da injeção, conseguiram estimular diversos comportamentos, tais como o voo, natação, corrida. No início dos anos 90, Martin Hammer estudou a influência da OA na memória e aprendizagem de abelhas, concluindo que é necessária a existência de quimiorreceptores na região bucal, que transmitem a informação aos grandes centros cerebrais através do lóbulos olfactivos e *corpora pedunculata*. Nas abelhas, os efeitos da OA traduzem-se pela capacidade de reconhecimento entre os elementos do mesmo grupo, e o aumento da agressividade contra elementos estranhos é resultante de elevadas concentrações de octopamina.

Apesar de ainda pouco estudados actualmente, os efeitos da OA já eram conhecidos na antiga China, embora de forma empírica, onde os apostadores eram atraídos pelas lutas de grilos. Cada vez que um dos combatentes sofria uma derrota, tinha de voltar à arena, onde geralmente voltava a perder. Para alterar este comportamento, os insectos eram obrigados a movimentar-se continuamente durante curtos períodos de tempo, ou submetidos a stress. Este tipo de tratamento aumenta os níveis de OA, permitindo que os insectos “vencidos” alterem o seu comportamento, tornado-se potenciais “vencedores” (Hofmann & Stevenson, 2000). Em 2004, Stevenson *et al.*, estudaram este paradigma da luta forçada, que resulta da maximização da agressividade dos grilos no primeiro encontro e recuperação da mesma pelos perdedores submissos após determinados períodos de voo, um efeito transitório coexistente com a activação do sistema octopaminogénico que acompanha o voo. Estes autores observaram uma diminuição da agressividade e a supressão do efeito do voo em grilos cujas reservas de octopamina e dopamina foram esgotadas, usando α -metil-tirosina (AMT). A utilização de um agonista da octopamina, clordimeform (CDM), permitiu restaurar a

agressividade em grilos tratados com AMT, indicando que o abaixamento da agressividade foi devido à deplecção da octopamina, e não à falta de dopamina.

Função da octopamina na regulação do metabolismo dos hidratos de carbono

Os hidratos de carbono, em conjunto com as proteínas e lípidos, constituem as principais classes de compostos orgânicos encontrados nos insectos e outros organismos. Contribuem para a estrutura e funcionalidade de todos os tecidos, podendo ser encontrados no núcleo, citoplasma e membranas das células, assim como na hemolinfa extracelular e nos tecidos de suporte (Chippendale, 1978).

O metabolismo dos hidratos de carbono nos insectos é semelhante ao dos vertebrados, contudo, ao contrário destes últimos, os insectos apresentam um exosqueleto de quitina (aminopolissacárido) e possuem também um dissacárido (trehalose) que funciona como uma forma de armazenamento de glucose (Chippendale, 1978).

A regulação enzimática através de metabolitos, iões e hormonas controla a taxa de interconversão do glicogénio, trehalose e glucose nos insectos. Este controlo tem sido estudado exaustivamente no corpo adiposo e em preparações de músculos, tendo mostrado especial importância na manutenção da homeostase e açúcares da hemolinfa. Foram identificados numerosos activadores e inibidores enzimáticos que regulam o fluxo de substratos através da síntese e degradação de glicogénio e trehalose (Chippendale, 1978). O autor sublinha o papel central da glucose 1-fosfato e da glucose 6-fosfato no controlo do metabolismo dos hidratos de carbono. Para além destes controlos metabólicos, uma hormona hiperglicémica (semelhante ao glucagon) e possivelmente uma hormona hipoglicémica (semelhante à insulina) também regulam o metabolismo dos hidratos de carbono.

Em 1961, Steele demonstrou pela primeira vez a existência de uma hormona hiperglicémica originada a partir do sistema neuroendócrino dos insectos, com base em estudos efectuados em *P. americana*. Desde então, a actividade hiperglicémica tem sido identificada noutras espécies, incluindo *L. migratoria* L., e *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), entre outras. A hormona foi parcialmente caracterizada e identificada como sendo um polipéptido segregado pelo *corpora cardiaca* (Chippendale, 1978). Segundo este autor, a formação de glucose 1-fosfato a partir das reservas de glicogénio presentes no cordão nervoso de *P. americana* é controlada por uma amina fenólica endógena (octopamina) e pela hormona hiperglicémica. Tal como a hormona hiperglicémica, a octopamina aparenta ter capacidade para activar a fosforilase glicogénio, através do aumento da taxa de síntese de AMP-cíclico, para além de ser o agente glicogenolítico primário no cordão nervoso. A glucose 1-fosfato libertada do glicogénio permanece no cordão nervoso para providenciar uma fonte de energia para o metabolismo neural (Chippendale, 1978).

3. Problemas inerentes à comercialização de biopesticidas de origem vegetal

Segundo Isman (2002), as alternativas à utilização de insecticidas sintéticos incluem biopesticidas (e.g. *Bacillus thuringiensis*, baculovírus entomopatogénicos), feromonas (e.g. perturbação do comportamento de acasalamento) e os insecticidas de origem vegetal, como é o caso da rotenona e da nicotina. Contudo, o autor refere alguns factores que poderão ser limitantes relativamente à produção em escala industrial, como a disponibilidade de material vegetal, a uniformização e purificação, a protecção da tecnologia e a homologação.

A disponibilidade de material vegetal implica o fornecimento constante de biomassa vegetal, e portanto, a utilização de plantas facilmente propagáveis.

A uniformização e purificação visam a demonstração da qualidade uniforme e constante dos produtos que os fabricantes colocam no mercado. A uniformização é importante devido às variações das propriedades químicas de um insecticida de origem vegetal, que ocorrem em função de factores geográficos, genéticos, climáticos, anuais ou sazonais. Para este efeito, o fabricante deverá dispor de métodos de análise adequados para quantificar as matérias activas que serão submetidas ao controlo de qualidade e homologação. No caso da purificação, a sua importância é devida ao facto das concentrações naturais das matérias activas serem bastante inferiores às necessárias para a obtenção de uma formulação comercial, o que obriga o fabricante a recorrer frequentemente a um processo de purificação química de extractos ou fracções que poderão ser utilizados como matéria activa técnica. Este processo implica um aumento do preço do produto final, pois cada etapa de purificação significa um acréscimo considerável dos custos de produção.

A protecção da tecnologia é outro factor importante, que permite aos fabricantes a colocação de produtos no mercado, salvaguardando a exclusividade das tecnologias de fabrico.

Relativamente à homologação, nos países industrializados (Oeste da Europa, América do Norte, Japão), a homologação constitui um obstáculo à comercialização de novos insecticidas de origem vegetal. Parte do problema é devida ao facto dos sistemas de homologação examinarem e regulamentarem insecticidas de síntese de uso agrícola, contendo geralmente uma única matéria activa e apresentando uma composição uniforme. Isman (2002) considera que a dificuldade encontrada pelas entidades reguladoras na avaliação da eficácia e inocuidade para a saúde humana e o ambiente de produtos constituídos por diversas matérias activas cuja caracterização química não se encontra claramente estabelecida e que apresenta uma composição variável não é surpreendente.

De acordo com D'Antuono & Elementi (2006), os óleos essenciais encontram-se amplamente disponibilizados por diversas indústrias. Estes autores afirmam que ainda existe espaço para melhorar a forma comercial dos óleos essenciais, sobretudo no que respeita às novas formas de extracção (fluidos supercríticos e água sub-crítica) e forma de apresentação (susceptibilidade de incorporação em sistemas hidrofílicos, microencapsulação, etc.).

A inclusão dos insecticidas de origem vegetal nos biopesticidas tem levantado algumas questões. Regnault-Roger *et al.* (2002) referem que, para alguns autores, o termo biopesticida é reservado aos agentes de luta biológicos, como os artrópodes entomófagos, bactérias, fungos entomopatogénicos, mas a definição etimológica indica os biospesticidas como sendo todos os

pesticidas de origem biológica, ou seja, organismos vivos ou substâncias de origem natural sintetizadas por estes, e de uma forma mais geral, todos os produtos de protecção de plantas que não têm origem química.

4. As Formigas e o efeito da octopamina

Posição sistemática e características gerais

Segundo Daly *et al.* (1998), as formigas representam um dos grupos de insectos com maior sucesso, devido à sua grande ubiquidade, encontrando-se numa elevada variedade de habitats, que se estendem desde os Trópicos até ao Pólo Norte, excluindo as zonas montanhosas de maior altitude. A grande variedade de habitats ocupados pelas formigas inclui também as metrópoles, onde se encontram associadas aos seres humanos.

As formigas pertencem à ordem Hymenoptera, família Formicidae. Englobam mais de 12 000 espécies e 200 géneros em todo o mundo (Gómez & Espadaler, 2007).

De acordo com Daly *et al.* (1998), apesar do tamanho e hábitos variáveis, são facilmente reconhecíveis pelo protórax de grandes dimensões, abdómen peciolado e antenas em forma de cotovelo, característica que as inclui na família Formicidae. Em termos comportamentais, formam níveis de sociedade avançados (eusociedade), organizados com base na divisão de tarefas atribuída a cada casta. Segundo Gullan (1994), o comportamento eusocial das formigas é caracterizado por três tipos de acções, que englobam os cuidados dos adultos relativamente aos juvenis, a permanência de pelo menos duas gerações de adultos na mesma colónia, existência de indivíduos reprodutores (machos e rainhas) e indivíduos sexualmente neutros, como as obreiras e soldados. Os indivíduos com funções sexuais apresentam maiores dimensões relativamente às castas não sexuais. Depois do acasalamento, as fêmeas perdem as asas e os machos morrem pouco tempo depois, mas mantêm as asas durante o tempo de vida. As obreiras e os soldados são sempre ápteros.

Em relação ao desenvolvimento, as formigas passam por 4 estados de desenvolvimento, ovo, larva, pupa e adulto. Tal como acontece com todos os insectos que sofrem metamorfoses completas, as formigas atingem a dimensão máxima após o estado de pupa. As larvas são ápodas e têm de ser alimentadas pelas obreiras através de um processo designado por trofalaxia, que consiste na regurgitação de alimento líquido a partir das reservas internas. Este comportamento é característico dos insectos eusociais, e não se restringe à alimentação das larvas, segundo Daly *et al.* (1998), o processo da trofalaxia é importante também na distribuição de alimento entre adultos e feromonas sociais na colónia. Estas últimas têm elevada importância na interacção entre os indivíduos da colónia, permitindo a identificação de elementos provenientes de outras colónias, através do olfacto. As feromonas libertadas pela rainha têm como função a inibição do desenvolvimento de outras rainhas, e podem ser diluídas quando as colónias apresentam grandes dimensões, podendo levar ao aparecimento de novas rainhas. O reconhecimento do parentesco é feito através de feromonas individuais que consistem em combinações de hidratos de carbono na cera cuticular que permite o reconhecimento entre parentes próximos pertencentes à colónia (Daly *et al.*, 1998). Segundo Boulay

et al. (2000), as interacções sociais, como é o caso da trofalaxia permitem a homogeneização dos hidratos de carbono de forma a uniformizar a mistura epicuticular, necessária à manutenção da integridade da colónia. No entanto, de acordo com Daly *et al.* (1998), existe a ameaça dos inimigos naturais, muitas colónias são exploradas por insectos mirmecófilos, como é o caso dos escaravelhos, por exemplo, que podem apresentar alterações morfológicas de forma a apresentarem semelhanças tácteis com o hospedeiro.

A formação da colónia é feita por fêmeas, e pode durar vários anos. Segundo Daly *et al.* (1998), a colónia pode ser constituída por uma única rainha e dezenas de indivíduos, ou, dependendo do tamanho, por várias rainhas e milhares de indivíduos. Normalmente as colónias são estabelecidas em locais fixos, podendo variar de galerias escavadas no subsolo, na madeira morta, em lançamentos de plantas, até folhas vivas de árvores e arbustos.

Os hábitos alimentares das formigas são variados, estas podem ser herbívoras, detritívoras e predadoras, embora o sejam ocasionalmente na maioria das espécies.

Muitas espécies estabelecem relações mutualistas, isto é, relações interespecíficas que beneficiam as espécies envolvidas Daly *et al.* (1998). Segundo este autor, as formigas do género *Pseudomyrmex* estabelecem relações simbióticas com plantas do género *Acacia*. Outro exemplo de relação de mutualismo ocorre entre formigas e homópteros, da qual estes beneficiam da protecção contra os inimigos naturais, e as formigas obtêm alimento a partir das excreções de melada.

O género *Aphaenogaster*

Segundo Gómez e Espadaler (2007), são conhecidas mais de 160 espécies e mais de uma dezena de espécies fósseis distribuídas por todo o mundo do género *Aphaenogaster* Mayr, com excepção da América do Sul e da África do Sul.

Estes autores afirmam que, de acordo com Holldobler & Wilson (1990), estas formigas nidificam sempre no solo. Os ninhos encontram-se frequentemente equipados com um grande número de entradas num espaço relativamente pequeno, que poderão ou não estar cobertas de pequenas pedras ou outros objectos, dependendo da natureza do terreno onde se encontram escavados. Tal como acontece noutros géneros, os rastros deixados por estas formigas em direcção ao alimento são específicos de cada ninho, permitindo que as formigas reconheçam se o rastro detectado pertence ou não a formigas do seu ninho. As obreiras da espécie *Aphaenogaster senilis* Mayr apresentam um aspecto geral mate e o corpo coberto de pilosidade branca, de dimensões variáveis entre 5-5,7 mm (Gómez e Espadaler, 2007). Segundo Collingwood e Prince (1998), *A. iberica* Emery, *A. senilis* Mayr, *A. gibbosa* Latreille são espécies comuns em Portugal.

O género *Tapinoma*

Segundo Gómez e Espadaler (2007), são conhecidas mais de 60 espécies do género *Tapinoma* Förster, sendo a maioria residente nas regiões Etiópica e Indo-Australiana. As colónias podem apresentar variações: um só ninho poderá ter cerca de uma dezena de obreiras e apenas uma rainha, ou mais comumente, milhares de obreiras e centenas de rainhas, distribuídas em vários ninhos em determinada área. A nidificação pode ocorrer numa grande variedade de locais, nas calçadas das cidades, no solo, debaixo de pedras, em árvores, etc..

Existem quatro espécies deste género em Portugal, sendo a espécie *Tapinoma nigerrimum* Nylander a espécie mais comum no sul do país, distinguindo-se pela presença de obreiras de grandes e pequenas dimensões na mesma colónia, ao contrário das espécies monomórficas (Collingwood & Prince 1998).

Efeito da octopamina

As formigas são insectos sociais, e como tal permanecem em contacto permanente entre si. Estudos efectuados por Boulay *et al.* (2000), em *Camponotus fellah* Dalla Torre (Hymenoptera: Formicidae), vulgarmente conhecida como formiga carpinteira, permitiram verificar que quando uma obreira isolada experimentalmente durante 5 dias, se volta a reunir com elementos do formigueiro, entra em trofalaxia prolongada, para sofrer uma re-integração na colónia, através da troca de hidratos de carbono específicos. Estes autores verificaram que a administração de octopamina reduz não só a trofalaxia como também a transferência de hidratos de carbono, mas não afecta a sua biossíntese, o que lhes permitiu lançar a hipótese que atribui à octopamina um papel mediador de padrões relacionados com a ligação social. A aplicação de fentolamina (antagonista da octopamina) isolada não produziu efeito a nível da trofalaxia, mas ao ser co-administrada com octopamina, reduz o efeito da octopamina isolada e restabelece os níveis de trofalaxia. Ainda neste estudo, os autores verificaram que a administração de octopamina pode reduzir o efeito de privação social, podendo ser parcialmente responsável pela coesão social entre indivíduos pertencentes à mesma colónia de formigas.

Segundo Gronenberg (1999), nas formigas, os centros de aprendizagem e memória (*corpora pedunculata*) são relativamente grandes em comparação com os das abelhas, visto que os lobos ópticos das formigas são consideravelmente menores, mas a morfologia geral é semelhante.

5. Pragas que afectam o género *Mentha* L.

Os campos da cultura de menta constituem habitat de diversos organismos vivos, a maior parte dos quais não é prejudicial à cultura. Pelo contrário, a maioria destes residentes é benéfica na medida em que providencia reciclagem de nutrientes, controlo biológico e fonte de alimento para os artrópodes auxiliares. Contudo, existem diversos artrópodes, moluscos, nemátodes, doenças e infestantes que causam prejuízo às culturas de menta (Morris, 2006).

Na bibliografia da especialidade consultada, a informação relativa às pragas que afectam *M. cervina* e *M. pulegium* em Portugal é escassa ou inexistente, tendo sido encontrada apenas uma referência a uma espécie de afídeo (*Ovatus crataegarius* Walker) identificada como praga de *M. pulegium* (Ilharco, 1973). Devido a este facto, as espécies apresentadas no presente trabalho foram as identificadas como pragas que afectam o género *Mentha* L. nos E.U.A.. A distribuição de algumas das referidas espécies em países europeus e respectivas regiões autónomas encontra-se referida no quadro B1 do Anexo B. De acordo com Morris (2006), a maioria dos artrópodes não é prejudicial para as culturas de menta, podendo até ser benéficos (organismos auxiliares). Contudo, existem algumas espécies que podem causar estragos e que são descritas seguindo o critério do autor, que as classifica em dois grupos, o dos artrópodes que habitam primariamente o solo e o dos que afectam as folhas.

5.1. Artrópodes

5.1.1. Pragas do solo

Symphyla: Scutigerellidae - De acordo com Morris (2006), a espécie principal que afecta as culturas de menta é *Scutigerella immaculata* Newport, vulgarmente conhecida como sinfilio dos jardins. São artrópodes do solo pertencentes à classe Symphyla. Os juvenis apresentam 6 pares de patas enquanto os adultos possuem 12. Ainda segundo este autor, a postura ocorre no início da Primavera ou do Outono e os ovos eclodem num período de 8 a 28 dias, dependendo das condições de temperatura. Alimentam-se de raízes de menta, conduzindo ao aparecimento de manchas constituídas por plantas doentes ou mortas nos campos cultivados. As formas imaturas e os adultos alimentam-se de raízes. Ao alimentarem-se de raízes de grandes dimensões, formam pequenos buracos, sendo as raízes mais finas consumidas por completo (Capinera, 2001).

Coleoptera: Chrysomelidae – *Longitarsus ferrugineus* Foudras (= *waterhousei* Kutschera) é um pequeno escaravelho cor de bronze com os membros posteriores adaptados ao salto, cujo leque de hospedeiros possivelmente se restringe às mentas, causando sérios problemas aos produtores de menta dos Estados Unidos, pois é uma praga difícil de controlar e que causa elevada perdas com grande frequência (Bienvenu, 2002; Morris, 2006). Após a eclosão dos ovos, as larvas alimentam-se de rizomas, onde permanecem até Maio ou Junho, saindo nesta altura para puparem. No estado larvar, alimentam-se dos órgãos subterrâneos das plantas (rizomas), o que resulta no aparecimento de manchas de plantas mortas ou doentes nos campos cultivados (Bienvenu 2002, Morris 2006).

Os adultos emergem em cerca de 3 semanas e alimentam-se de folhas durante 2 a 3 semanas depois da postura. O número exacto de ovos postos por fêmea é desconhecido. Ocorre mais do que uma geração por ano (Morris, 2006).

A dispersão desta espécie de um campo para o outro poderá ser feita através de maquinaria agrícola e no interior de rizomas. Apesar da maioria dos adultos não conseguir voar a longas distâncias, algumas fêmeas adultas possuem asas bem desenvolvidas, que as capacitam para dispersar por áreas maiores através do voo. As larvas alimentam-se de rizomas de menta, matando as plantas directamente, ou abrindo feridas que funcionam como porta de entrada de organismos responsáveis pela podridão radicular. O efeito dos estragos causados por estes insectos pode ser observado entre meados de Abril a Junho e incluem o aparecimento de manchas irregulares nas culturas de plantas de coloração purpúrea, com problemas de desenvolvimento, mortas ou a evidenciarem sinais de seca. Apesar de a alimentação dos adultos resultar no aparecimento de buracos redondos de pequenas dimensões nas folhas, o estrago raramente é observado (Morris, 2006).

Coleoptera: Curculionidae – A espécie *Pseudobaris nigrina* Say é um gorgulho de pequenas dimensões e coloração negra. A postura é feita sobre a superfície do solo, próximo dos caules de menta. Após a eclosão dos ovos, as larvas perfuram os caules desenvolvendo-se no seu interior, saindo mais tarde para puparem (Morris, 2006).

Os gorgulhos das raízes constituem pragas das culturas de menta, em particular o gorgulho das raízes do morangueiro, *Otiorhynchus ovatus* L., que é a espécie mais conhecida, embora tenham sido encontradas outras espécies, algumas ainda por identificar (Morris, 2006; Gianessi, 2009).

Os adultos que apresentam maior importância na cultura de menta são as fêmeas, que produzem ovos férteis mesmo sem acasalarem. As larvas alimentam-se das raízes e rizomas de menta, resultando no aparecimento de peladas nos campos cultivados. Os adultos são mais activos durante a noite (Lindqvist & Tuovinen, 2006; Morris, 2006).

Berry & Fischer (1993) referem outras espécies que aparecem com frequência nas culturas de menta, tais como *Otiorhynchus sulcatus* Fabricius, *Otiorhynchus rugosostriatus* Goeze e *Sciopithes obscurus* Horn, para além de outras espécies não identificadas.

Coleoptera: Elateridae - Segundo Morris (2006), *Limoniuss canus* LeConte, *Limoniuss californicus* Mannerheim, *Ctenicera pruinina* Horn, vulgarmente conhecidos como alfinetes, são as três espécies mais comuns que surgem nas culturas de menta nos Estados Unidos. De acordo com este autor, os ovos são postos abaixo da superfície do solo e eclodem passado 3 a 4 semanas e as larvas alimentam-se durante 2 a 5 anos antes de puparem, causando estragos ao alimentarem-se de raízes e rizomas. Este facto é especialmente problemático quando se trata de plantas propagadas por estaca, plantadas em estufa. As plantas afectadas apresentam como principais sintomas a murchidão acompanhada de uma coloração purpúrea, e problemas a nível do desenvolvimento.

As larvas de *L. canus* e *L. californicus* apresentam vasto leque de hospedeiros, que incluem, entre outros, couve-flor, milho, mostarda, batata, tomate e culturas que apresentam um sistema radicular substancial ou tubérculos. As larvas de *Limoniuss* spp. são activas e por vezes apresentam tendências canibalísticas. Os adultos têm hábitos alimentares variados, que incluem raízes de beterraba, folhagem de diversas plantas e pólen. Os inimigos naturais são escassos e apresentam relativa ineficácia. As aves insectívoras para além de se alimentarem de larvas, também são predadoras de adultos tal como os escaravelhos predadores do solo (Coleoptera: Carabidae) (Capinera 2001). De acordo com Capinera (2001), *Psilocephala frontalis* Cole (Diptera: Therevidae) é talvez o inimigo natural mais importante. As larvas desta espécie encontram-se no solo e assemelham-se aos alfinetes, sendo por vezes confundidas com escaravelhos. Alimentam-se das larvas de alfinetes através de orifícios no tegumento.

A biologia das diversas espécies do género *Limoniuss* é semelhante. A duração do ciclo de vida é variável, no caso do alfinete da beterraba varia entre 1-5 anos. Os adultos emergem na Primavera, fazem a postura e as larvas pupam no Outono. Ao contrário de outras espécies de

alfinetes, *Ctenicera* spp. toleram condições de secura e atacam culturas em regiões áridas, onde são normalmente encontradas. Contudo, apresentam um vasto leque de hospedeiros (Capinera, 2001).

Diptera: Tipulidae – Segundo Morris (2006), as espécies *Tipula paludosa* Meigen e *T. oleracea* Linnaeus afectam diversas culturas do género *Mentha*, mas poderão existir outras espécies que ainda não foram estudadas. São originárias do noroeste da Europa, mas tornaram-se um problema na América do Norte (Blackshaw & Petrovskii, 2006). A espécie *T. paludosa* abrange grande variedade de plantas hospedeiras, incluindo infestantes. As larvas alimentam-se de numerosas plantas, mas geralmente são consideradas pragas de pastagens e de relvados. Entre as culturas afectadas são de referir a beterraba, couve, couve-flor, milho, alface e ervilha. Outras culturas, tais como cevada, trigo mourisco, trevo, aveia, morangos, tabaco e trigo, são também afectadas (Brunel, 1989; Capinera, 2001; Blackshaw & Petrovskii, 2006; Morris, 2006). As larvas poderão sobreviver sobre matéria orgânica em decomposição. Os adultos de ambas as referidas espécies dispersam-se através do voo. A presença das larvas pode ser detectada através da observação de rebentos cortados caídos sobre a superfície do solo (Morris, 2006).

Relativamente ao ciclo de vida, *T. paludosa* apresenta apenas uma geração anual, enquanto *T. oleracea* tem duas gerações por ano, uma na Primavera e outra no Outono. Os ovos são postos no solo e eclodem logo após a queda de chuva ou rega (Morris, 2006). Os ovos de *T. paludosa* apresentam uma coloração negro-purpúrea brilhante, com 0,4 mm de comprimento e 1,1 mm de largura, achatados numa das extremidades, são depositados na superfície do solo, geralmente à profundidade de 1 cm, rodeados de solo húmido para evitar a dissecação. A eclosão ocorre após 11-15 dias (Capinera, 2001).

As larvas de *T. paludosa* atingem o 4º instar em Abril, e pupam em Agosto. Numa rápida sucessão os adultos emergem, os ovos são depositados e as larvas começam a crescer em Setembro. Os dois primeiros instares completam-se em Novembro, quando o crescimento larvar diminui (Capinera, 2001). De acordo com este autor, as larvas apresentam forma cilíndrica, gradualmente adelgada nas extremidades, particularmente na extremidade anterior. A coloração pode variar entre o acinzentado e o verde acastanhado, por vezes apresentam pontuações. Após eclosão, o comprimento das larvas é de cerca de 3 mm, podendo atingir os 40 mm na maturidade. A duração do 1º e 2º estádios larvares é de cerca de 14 dias, o 3º estádio dura vários meses, devido à coincidência com o Inverno, e o último estádio tem uma duração de 3-4 meses. Capinera (2001) refere ainda que, nas 6-8 semanas finais da vida larvar, as larvas não se alimentam, permanecendo relativamente inactivas, contudo, nos últimos dias do estado larvar, descem a uma maior profundidade no solo e preparam-se para pupar. A pupa é semelhante à larva na maturação em termos de forma e tamanho. A duração do estádio pupal é de 2-3 semanas. Quando o adulto está pronto para emergir, a pupa desloca-se até à superfície do solo (Capinera, 2001).

Os adultos de ambas as espécies são semelhantes a mosquitos de grandes dimensões e dispersam-se através do voo (Brunel, 1989; Morris, 2006).

As larvas causam prejuízo nas culturas de menta ao alimentarem-se de rizomas e rebentos (Morris, 2006). Capinera (2001) chama a atenção ao facto das larvas não se restringirem apenas aos

referidos órgãos, trepando pela planta durante a noite, atacando também as folhas e os caules. Segundo este autor, na presença de um grande número de larvas as plantas acabam por morrer.

De acordo com Morris (2006), o efeito dos inimigos naturais nas populações de tipulídeos presentes nas culturas de menta ainda não foi determinado. As toupeiras e algumas aves são frequentemente citados como predadores das larvas, mas não são conhecidos efeitos a nível da supressão das populações (Capinera, 2001). Este autor refere o parasitóide larvar *Siphona geniculata* De Geer (Diptera: Tachinidae) como sendo o inimigo natural mais importante, introduzido na América do Norte pelos europeus. De uma forma geral, as condições climáticas desfavoráveis mais importantes do que os inimigos naturais (Morris, 2006; Blackshaw & Petrovskii, 2007).

Lepidoptera: Noctuidae – As lagartas do solo são os estados larvares de diversos noctuídeos (traças) que sobrevivem ao Inverno sob a forma de ovos, larvas ou pupas no solo, junto às plantas (Gallo *et al.*, 1970; Morris, 2006). A dispersão da maioria das espécies é feita através do voo, podendo ocorrer em qualquer altura entre a Primavera e o Outono (Capinera, 2001). Diversas espécies que se alimentam de folhagem durante o Inverno também podem ser encontradas no solo, como por exemplo, *Peridroma saucia* Hübner e *Xestia* (Megasema) *c-nigrum* L., passam o Inverno no solo sob a forma de larvas, e na Primavera alimentam-se de rebentos de menta (Morris, 2006). De acordo com este autor, as larvas causam prejuízos ao alimentarem-se de rizomas e rebentos, o que resulta no aparecimento de zonas de crescimento irregular nas culturas (peladas), e de rebentos cortados caídos no solo, que constituem uma indicação da actividade das lagartas. Para além das espécies já mencionadas, Morris (2006) refere ainda um complexo de seis espécies do género *Euxoa* Hübner e a espécie *Agrotis ipsilon* Hufnagel, como sendo as mais comuns nas culturas de menta. Esta última espécie é polífaga e é considerada uma das pragas mais severas no Egipto e no Brasil. Para além da cultura de menta apresenta num vasto leque de hospedeiros que inclui, por exemplo, as culturas de alho, beringela, beterraba, couve chinesa, espargo, feijão, milho, mostarda, tomate, trevo (Capinera, 2001; Morris, 2006; Bento *et al.*, 2007; Shadia *et al.*, 2007). O número de gerações anuais pode variar entre 1-2 e 2-4 e o ciclo de vida tem uma duração normal de 35-60 dias. Os ovos têm forma esférica e apresentam inicialmente uma coloração branca, que se torna castanha com o passar do tempo, eclodindo 10 – 14 dias após a postura (Capinera, 2001; Stoll, 2002). As larvas apresentam uma coloração que varia do cinzento-claro ao cinzento acastanhado ou quase negra. A observação pormenorizada da epiderme larvar revela a existência de grânulos grosseiros de coloração escura ao longo do corpo. As larvas apresentam normalmente 6-7 instares. Permanecem na planta até ao 4º instar, altura em que se tornam fotonegativas e escondem-se no solo durante o dia, arrastando os tecidos das plantas para baixo da superfície do solo, mas também têm hábitos de canibalismo nesta fase. O estágio de pupa tem duração de 12-20 dias e ocorre à profundidade de 3-12 cm. Os adultos atingem elevadas dimensões, a distância entre a extremidade das asas poderá atingir 40-55 mm. As asas dianteiras apresentam uma coloração castanho-escura uniforme, com a área distal marcada por uma banda mais clara irregular e as asas posteriores têm uma coloração que varia do cinzento ao esbranquiçado. O período de pré-oviposição é de cerca de 7-10 dias (Capinera, 2001).

São conhecidas numerosas espécies de inimigos naturais associados a esta espécie referidas por Capinera (2001), por exemplo, espécies de parasitóides tais como *Cotesia marginiventris* (Cresson), *Microplitis feltiae* Muesebeck, *Microplitis keweleyi* Muesebeck (Hymenoptera: Braconidae), entre outras.

A espécie *P. saucia* apresenta um vasto leque de hospedeiros que incluem diversas culturas tais como alface, batata, batata-doce, couve chinesa, espargos, espinafre, feijão, couve-de-bruxelas, menta, entre outras, diversas árvores de fruto e infestantes, tendo sido referenciada como praga no Canadá, Estados Unidos e na Europa (Capinera, 2001; Inomata *et al.*, 2002; Morris, 2006).

O número de gerações anuais varia entre 2 e 4. Os ovos são hemisféricos, achatados na extremidade que forma uma ligação com as folhas ou caules das plantas hospedeiras. As larvas apresentam normalmente 6 instares, coloração cinzento-acastanhada a negro acinzentado com uma mancha dorsal esbranquiçada ou amarela. As larvas formam uma célula no solo e pupam perto da superfície. A pupa apresenta uma coloração castanha e mede entre 15-23 mm de comprimento e 5-6 mm de largura. A duração do estágio de pupa é de 33 e 15 dias, respectivamente, à temperatura de 15° e 25°C. Os adultos atingem elevadas dimensões, a distância entre as extremidades das asas dianteiras poderá atingir 43-50 mm. As asas dianteiras apresentam coloração cinzento acastanhada com a parte central avermelhada e a parte distal castanho escura. A oviposição tem início aos 7-14 dias após a emergência dos adultos. As larvas causam elevada mortalidade nas plantas jovens ao fazerem cortes nos caules junto à superfície, mas actuam também como desfoliadoras de plantas de pequenas dimensões, e têm a capacidade de subir às árvores a fim de se alimentarem de gomos e folhagem. As larvas imaturas podem permanecer na folhagem durante o dia, mas alimentam-se principalmente ao anoitecer. As larvas de maiores dimensões geralmente escondem-se no solo ou noutros locais abrigados durante o dia, movendo-se para áreas de folhagem expostas ao anoitecer para se alimentarem. Embora seja raro, as larvas podem assumir hábitos gregários quando atingem elevadas densidades (Capinera, 2001). Ainda de acordo com este autor, são conhecidos numerosos inimigos naturais de *P. saucia*, que incluem, entre outros, parasitóides, responsáveis pela maior parte da mortalidade em larvas.

Lepidoptera: Pyralidae – De acordo com Morris (2006), a espécie *Fumibotys fumalis* Guenée passa o Inverno na fase de pré-pupa no interior de hibernáculo, pupando na Primavera. Logo após a emergência, as fêmeas acasalam e cerca de uma semana depois fazem a postura nas folhas de menta. Após a eclosão dos ovos, as larvas caem no solo e introduzem-se nos rizomas que abandonarão entre o final de Agosto e Setembro para construir os hibernáculos. Existe apenas uma geração anual.

5.1.2. Pragas foliares

Prostigmata: Tarsonemidae – De acordo com Morris (2006), a condição designada por *Squirrley mint* é conhecida há mais de 50 anos, mas a sua causa não tinha sido determinada até os sintomas terem sido relacionados com um ácaro dos gomos pertencente à família Tarsonemidae.

Segundo Delahaut (1999), *Tarsonemus* Canestrini & Fanzago (*Floridotarsonemus* sp. Attiah) são ácaros de dimensões muito pequenas, que infestam os gomos, mas não produzem sintomas visíveis até ao final da estação. Ocorrem várias gerações anuais.

Segundo Morris (2006), os sintomas em hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) incluem formação de feixes nas folhas do topo, e as plantas afectadas sofrem uma redução de cerca de 80% na produção de óleo.

Prostigmata: Tetranychidae – Segundo Morris (2006), os ácaros sofrem dispersão por acção do vento, na maioria dos casos. Segundo Almeida (2006) e Morris (2006) que refere que, de acordo com Helle & Sabelis (1985), a espécie mais frequentemente encontrada em menta é *Tetranychus urticae* Koch, que também se alimenta de outras culturas, incluindo milho, lúpulo, batata e morango. Segundo Bienvenu (2002), em condições de seca, os elevados níveis de infestação por *T. urticae* resultam na perda de folhas, em particular das folhas que se encontram na parte inferior das plantas, resultando na alteração da composição química do óleo, em particular na redução do mentol.

A ampla distribuição das espécies de ácaros é devida em grande parte ao seu tamanho reduzido e facilidade com que são inadvertidamente transportados. A grande variedade de hospedeiro permite o estabelecimento rápido em novos locais (Capinera 2001). Segundo este autor, os inimigos naturais dos ácaros são numerosos e diversos. Entre os mais importantes encontram-se ácaros predadores, em particular *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae), joaninhas, em particular *Stethorus* spp. (Coleoptera: Coccinellidae), *Orius* spp. (Hemiptera: Anthocoridae), mirídeos (Hemiptera: Miridae), entre outros. Com um ciclo de vida de apenas 8-12 dias a 30°C e cerca de 17 dias a 20°C, podem desenvolver-se mais de 20 gerações anualmente, ainda que as condições ambientais raramente permitam que se mantenha esta taxa de crescimento.

Hemiptera: Aphididae – Os estragos causados pelos afídeos nas mentas são caracterizados pela perda de folhas, redução no vigor das plantas e produção de melada, que interfere com a operação de colheita (Morris, 2006). Apesar dos estragos causados, este autor considera o facto dos afídeos não constituírem vectores de doenças das mentas como sendo um aspecto positivo. De acordo com Berry & Fisher (1993) o afídeo das mentas, *Ovatus crataegarius* Walker passa o Inverno na forma adulta nos rizomas e nas zonas do caule abaixo da superfície do solo. Ilharco (1973) refere a espécie *M. pulegium* como sendo hospedeira desta espécie em Portugal. Na Primavera, as fêmeas adultas dão origem a ninfas móveis. Uma geração poderá completar em 7 a 10 dias durante o Verão, chegando a ser produzidas 12 a 15 gerações por ano. Os afídeos podem dispersar através do voo ou dos rizomas.

Lepidoptera: Noctuidae – De acordo com Lacy *et al.* (1981), Berry & Fisher (1993), existem cinco espécies de lagartas da parte aérea que se alimentam de folhas de menta provocando estragos com frequência: *Autographa californica* Speyer, *Mamestra configurata* Walker, *Trichoplusia ni* Hübner, *Xestia c-nigrum* e *Peridroma saucia*.

De acordo com Capinera (2001), *A. californica* alimenta-se de diversas culturas que incluem, por exemplo, alface, beterraba, cebola, cenoura, girassol, entre outras. Ainda de acordo com este autor, entre os principais inimigos naturais encontram-se os parasitóides *Voria ruralis* Fallén (Diptera: Tachinidae), *Microplitis* spp., *Apanteles yakutatensis* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae), *Campoletis sonorensis* Cameron e *Patroclides montanus* Cresson (Hymenoptera: Ichneumonidae). Estima-se que o ciclo de vida completo tenha a duração de 30-40 dias. As larvas são desfoliadoras, inicialmente podem ser gregárias, mas acabam por dispersar, deixando buracos irregulares na folhagem depois de se alimentarem. Um sinal da presença das larvas é a existência de grandes quantidades de excrementos aderentes à folhagem.

De acordo com este autor, *M. configurata*, apesar de ser considerada praga generalista, apresenta preferência por plantas das famílias *Cruciferae* e *Chenopodiaceae*. As plantas hospedeiras incluem, entre outras, batata, beterraba, couve, couve-flor, milho, tomate e tabaco. As larvas são afectadas por doenças e parasitóides. Dos vários parasitóides conhecidos para este insecto, os mais comuns são *Banchus flavescens* Cresson (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Athrycia cinerea* Coquillett (Diptera: Tachinidae). As doenças incluem NPV (nuclear polyhedrosis virus), um fungo e um microsporídeo. Aparentemente existe apenas uma geração anual. Esta espécie permanece no solo durante um curto período de tempo. As larvas alimentam-se inicialmente de folhagem, formando buracos irregulares nas folhas. Contudo, ao atingirem a maturação, alimentam-se também de outros órgãos das plantas. Outra espécie que é possível encontrar na cultura de menta, embora com menos frequência é *Spodoptera praefica* Grote. Esta espécie tem hábitos alimentares generalistas. Entre as culturas mais afectadas encontra-se beterraba, cenoura, couve, tabaco, etc.. Aparentemente existem 3-4 gerações anuais, com descendência adulta presente entre os meses de Março-Maio, Maio-Junho, Julho-Agosto e Agosto-Novembro.

A espécie *T. ni* alimenta-se de uma grande variedade de culturas e infestantes, mas principalmente de plantas da família *Cruciferae*. Esta espécie é atacada por diversos inimigos naturais, cuja eficácia varia com o tempo, espaço e ambiente. Em relação aos inimigos naturais, a maioria dos estudos distingue a eficácia dos parasitóides himenópteros e NPV (*nuclear polyhedrosis virus*) (Capinera, 2001).

A espécie *X. c-nigrum* possui hábitos alimentares generalistas, apresenta um vasto leque de hospedeiros, que incluem flores, árvores de fruto e diversas culturas, como por exemplo, beterraba, cenoura, couve-flor, espargo, tomate. (Capinera, 2001).

Lepidoptera: Pyralidae – Segundo Capinera (2001), *Udea profundalis* Packard é uma praga com pouca importância, e não existe grande conhecimento relativo a esta espécie. Morris (2006) afirma que esta espécie normalmente se alimenta de folhas de menta durante a Primavera e o Verão.

Orthoptera: Acrididae – Diversas espécies do género *Melanoplus* alimentam-se de folhas de menta, causando estragos nas plantas (Morris, 2006).

5.1.3. Outras pragas

Morris (2006), refere algumas espécies de artrópodes que poderão constituir pragas ocasionais ou potenciais das mentas, tais como *Vanessa cardui* L. (Lepidoptera: Nymphalidae), larvas de diversas espécies de escaravelhos que são ocasionalmente encontradas a alimentarem-se de rizomas de menta (e.g. *Diabrotica undecimpunctata* Mannerheim (Coleoptera: Chrysomelidae), e mosquinha-branca, *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Homoptera: Aleyrodidae), entre outras.

5.2. Moluscos

As lesmas e os caracóis (Mollusca: Gastropoda: várias famílias) alimentam-se das partes mais tenras das plantas, acima e abaixo do solo. Algumas espécies de lesmas alimentam-se exclusivamente abaixo do solo. Os estragos causados por estes moluscos traduzem-se por buracos nas folhas, caules, tubérculos e outros órgãos. As lesmas e caracóis são mais activos durante a noite, mas normalmente encontram-se escondidos na vizinhança do estrago durante o dia. Para além dos estragos, a presença de lesmas e caracóis é também evidenciada pelos rastros viscosos de coloração prateada, visível mesmo depois de seca (Fenimore, 1984; Quintana, 2005).

As lesmas alimentam-se de tecidos de plantas, matéria orgânica em decomposição, e ocasionalmente de tecido animal. Apesar de aparentemente se alimentarem de uma grande diversidade de plantas, o seu padrão de preferências é semelhante ao dos insectos, e é frequentemente relacionado com os aleloquímicos das plantas (Morris, 2006). A actividade alimentar é favorecida pela humidade em conjunto com temperaturas elevadas, mas não em períodos de precipitação contínua. Os caracóis hibernam durante o Inverno, mas a maioria das lesmas alimenta-se durante todo o ano, quando as condições são favoráveis, sendo algumas espécies activas a temperaturas próximas do ponto de congelação (Fenimore, 1984).

As lesmas são pragas oportunistas, para além das culturas (e.g. beterraba, cenoura, milho, tomate, etc.), alimentam-se também de flores, infestantes e outros materiais. Ao contrário dos insectos, as lesmas são hermafroditas, isto é, cada indivíduo possui órgãos sexuais femininos e masculinos. Todavia, a auto-fertilização é rara, e as lesmas formam pares para a cópula. O processo de acasalamento requer alguns minutos, seguida de um período de vários dias a semanas antes do início da oviposição (Morris, 2006). Segundo este autor, *Derocera reticulatum* Müller é a espécie de lesma mais importante em termos económicos encontrada nas culturas de menta.

6. Doenças que afectam o género *Mentha* L.

Na bibliografia da especialidade consultada (Agrios, 2005; Farr, 1989; Morris, 2006) encontram-se referências a doenças causadas por fungos, vírus e nemátodes que podem afectar espécies pertencentes ao género *Mentha* L.. Segundo Morris (2006), a doença com maior relevância nos E.U.A. em termos de limitação da viabilidade económica de espécies de mentas comercializáveis é causada por fungos que causam uma doença designada por verticilose.

6.1. Verticilose

Esta doença é causada pelas espécies *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold, *V. albo-atrum* Reinke & Berthold var. *menthae* Ray Nelson, e *V. dahliae* Kleb., fungo polífago que afecta também as mentas. As plantas infectadas por *Verticillium* spp. sofrem uma diminuição em termos de produtividade, produção de óleo e taxa de sobrevivência durante o Inverno (Bhat & Subbarao, 1999; Johnson, 2006; Morris, 2006).

As folhas das plantas infectadas perdem turgidez, tornam-se mais claras e adquirem uma coloração verde amarelada, murcham, acabando por morrer. Quando a infecção ocorre na intersecção dos caules infectados com os lançamentos jovens, surgem áreas necróticas sob a forma de anel completo ou incompleto (Agrios, 2005).

6.2. Ferrugem

A ferrugem das mentas é causada pelo fungo *Puccinia menthae* Pers., que afecta apenas plantas do género *Mentha* (Horner, 1955; Pschiedt & Ocamb, 2004). Esta doença pode causar grandes prejuízos quer em culturas protegidas quer em culturas de ar-livre (Westcott, 1971).

As plantas afectadas por esta doença apresentam pequenas pústulas de cor alaranjada nas folhas e no caule. De acordo com May (2008) os principais sintomas causados pelo fungo *P. menthae* podem ser observados nas folhas mais velhas e caracterizam-se por manchas de formato arredondado e com um halo de coloração púrpura e centro claro. Este autor refere ainda que, em condições de grande severidade da doença, poderá ocorrer a queda total das folhas e, em consequência, a morte da planta.

6.3. Oídio

O oídio das mentas é devido ao fungo *Erysiphe cichoracearum* DC. (Zimowska, 2007). Surge sob a forma de pequenas manchas pulverulentas nas duas páginas das folhas. O crescimento do fungo dá-se primordialmente em tecidos jovens ou na folha inteira, podendo contudo afectar outros órgãos das plantas, cobrindo-os totalmente. Esta doença aumenta as perdas foliares, o que reduz a sobrevivência das plantas no Inverno (Pschiedt & Ocamb, 2004).

6.4. Podridão do caule e das raízes

A podridão da raiz e do caule das mentas é causada por diversas espécies de fungos, como por exemplo, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (*Nectria haematococca*) Berk. & Broome (teleomorfo), *Phoma strasseri* Moesz, (podridão negra do caule), *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Korf & Dumont (podridão branca das raízes e do caule) (Bobev, 2002; Morris, 2006).

Relativamente a *F. solani*, as raízes de plantas jovens apresentam uma coloração avermelhada, que se torna mais escura e atinge maiores dimensões ao longo do tempo (Agrios, 2005). Este autor refere ainda que a esta cor avermelhada poderá aparecer também no caule.

A maioria das podridões desenvolve-se com maior intensidade durante o Inverno e a Primavera, especialmente quando há excesso de rega (Morris, 2006).

A podridão do caule causada por *Phoma strasseri* é caracterizada pelas lesões de cor castanho-escura a negra e cancrios no caule e nos rizomas. As folhas das plantas infectadas tornam-se avermelhadas, acabando por morrer. Nos rizomas desenvolvem-se lesões negras e moles. O rizoma é a parte da planta mais afectada.

O fungo *R. solani* causa murchidão das plantas jovens (Agrios, 2005).

S. sclerotiorum reconhece-se facilmente nas plantas pela presença de micélio branco denso e esclerotos (sinais do fungo). Os caules apresentam inicialmente lesões claras ou castanho-escuras que com o evoluir da doença se recobrem por micélio cotonoso. Nos primeiros estádios da infecção as folhas apresentam o seu aspecto normal, mas à medida que a doença evolui o caule apodrece e a folhagem acima da lesão murcha e morre.

6.5. Cancro dos caules

Segundo Farr *et al.* (1989) fungos do género *Alternaria* podem provocar cancrios ao longo dos caules das mentas provocando apodrecimento e seca.

6.6. Alternariose

De acordo com Zimowska (2007), a espécie *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl. foi reconhecida como sendo a principal causa do aparecimento de manchas foliares castanhas e da desfoliação das plantas de menta. *A. alternata* apresenta elevada importância em termos económicos, causando perdas consideráveis nas culturas de menta.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal

Para a realização do presente trabalho, foram seleccionadas populações de *M. cervina* e de *M. pulegium* oriundas de diferentes zonas do país, e que posteriormente foram cultivadas em canteiros no campo experimental e de demonstração instalado no Parque Botânico da Tapada da Ajuda, do Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. Para cada população foi atribuído um código de duas letras, que indicam a espécie, seguido de um número, que indica a origem (Quadro 1).

Quadro 1 - Identificação dos locais de origem das populações de *Mentha cervina* L. e *Mentha pulegium* L. em cultura no Parque Botânico da Tapada da Ajuda do Instituto Superior de Agronomia, Lisboa (Adaptado de Póvoa 2008). (continua)

Nº amostra	Concelho	Localidade (próx.)	Origem ⁽¹⁾	Longitude	Latitude	Nº entrada Herbário
MC 1	Redondo	Aldeia da Serra	C	W7° 34' 04.2"	N38° 42' 46.1"	LISI 103/2007
MC 2	Mértola	Minas de S. Domingos	C	W7° 29' 58.7"	N37° 40' 38.4"	LISI 104/2007
MC 3	Aljustrel	Monte da Corte Margarida	C	W8° 06' 14.7"	N37° 56' 14.5"	LISI 105/2007
MC 4	Beja	Quinta da Suratesta	C	W7° 52' 21.8"	N38° 02' 15.0"	LISI 745/2008
MC 5	Mora	Foros de Mora	C	W8° 16' 40,1"	N38° 95' 25,2"	LISI 746/2008
MC 6	Vendas Novas	Campos da Rainha	C	W8° 18' 51.3"	N38° 37' 37.5"	LISI 747/2008
MC 7	Santiago do Cacém	Retiro do Pontão – Cercal do Alentejo	C	W8° 40' 52.9"	N37° 48' 26.2"	LISI 106/2007
MC 8	Santiago do Cacém	Pinhal do Concelho	C	W8° 44' 57.0"	N38° 00' 18.1"	LISI 749/2008
MC 9	Alcácer do Sal	Santa Catarina	C	W8° 25' 50.7"	N38° 23' 36.6"	LISI 748/2008
MC 10	Campo Maior	Ouguela; N.Sr.ª Enxara	S	W7.00072	N39.08195	LISI 532/2005
MC 11	Portalegre	S. Julião	C	W7° 31' 434"	N39° 32' 71.3"	LISI 750/2008
MC 12	Nisa	Monte do Pardo (Santana)	C	W7° 68' 11,0"	N39° 60' 17.3"	LISI 108/2007
MC 13	Ponte de Sôr	Escusa	C	W7° 981' 3.7"	N39° 33' 61.0"	LISI 109/2007
MC 14	Montargil	Farinha Branca	C	W7° 99' 01.1"	N39° 33' 29.0"	LISI 110/2007
MC 15	Redondo	Aldeia da Serra (S. Gregório)	C	W7° 96' 80.7"	N38° 79' 28.5 "	LISI 111/2007
MC 16	Reguengos de Monsaraz	Baldio (Carrapatelo)	C	W7° 49' 73.8"	N38° 46' 02.8 "	LISI 112/2007
MC 17	Amareleja	Safara	C	W7° 21' 28.1"	N38° 10' 58.2 "	LISI 113/2007
MC 18	Serpa	Serpa	C	W7° 60' 01.2"	N37° 94' 66.4 "	LISI 114/2007
MC 19	Portel	Santana de Portel	C	W7° 79' 86.2"	N38° 26' 83.4"	LISI 115/2007
MC 20	Alcáçovas	Estação de Alcáçovas	C	W8° 09' 51.9"	N38° 40' 53.8 "	LISI 751/2008

(1) S – Silvestre; C – Cultivada.

Quadro 1 – (continuação) Identificação dos locais de origem das populações de *Mentha cervina* L. e *Mentha pulegium* L. em cultura no Parque Botânico da Tapada da Ajuda do Instituto Superior de Agronomia, Lisboa (Adaptado de Póvoa 2008).

Nº amostra	Concelho	Localidade (próx.)	Origem(1)	Longitude	Latitude	Nº entrada Herbário
MC 21	Évora	Bairro da Comenda	C	W7° 89' 19.4"	N38° 57' 66.8 "	LISI 116/2007
MC 22	Monforte	Monforte	C	W7° 43' 54.1"	N39° 05' 43.5"	LISI 117/2007
MC 23	Sousel	Sousel	C	W7° 67' 49.7"	N38° 95' 68.4 "	LISI 752/2008
MC 24	Grândola	Canal Caveira	C	W8° 48' 80.3"	N38° 13' 36.6 "	LISI 118/2007
MC 25	Odemira	S. Teotónio	C	W8° 70' 52.8"	N37° 51' 22.7"	LISI 753/2008
MC 26	Odemira	Nave Redonda (Saboia)	C	W8° 49' 32.8"	N37° 40' 37.1 "	LISI 754/2008
MC 27	Almodôvar	Cansados (S. Barnabé)	C	W8° 09' 46.9"	N37° 37' 83.5"	LISI 755/2008
MC 28	Castro Verde	Quinta da Ordem	C	W8° 06' 92.2"	N37° 68' 50.0 "	LISI 756/2008
MC 29	Elvas	Ponte da Ajuda	S	W7° 17' 15.0"	N38° 77' 67.5 "	LISI 119/2007
MC 30	Alandroal	Rosário	C	W7° 33' 30,0"	N38° 6' 30.0"	LISI 757/2008
MC 31 ⁽²⁾	Monção	Bela	C	-	-	LISI 758/2008
MC 33	Miranda do Douro	Póvoa	S	W6.28523	N41.57519	LISI 529/2005
MC 34	Peso da Régua	Bagaúste	S	W7.75045	N41.14961	LISI 530/2005
MC 35	Figueira de Castelo Rodrigo	Escarigo	S	W6.82584	N40.84259	LISI 527/2005
MC 36	Idanha-a-Nova	Segura	S	W6.97975	N39.81982	LISI 558/2005
MC 40	Nisa	Montalvão	S	W7.54745	N39.65955	LISI 522/2005
MC 41	Valência de Alcantara	Alburel	S	W7.20641	N39.46721	LISI 520/2005
MC 42	Alcácer do sal	Torrão	S	W8.25334	N38.29019	LISI 533/2005
MC 43	Castro Verde	Entradas	S	W7.57406	N37.44103	LISI 557/2005
MP 1	Elvas	S. Vicente	S	W7°19' 51.3"	N38° 93' 47.3"	LISI 8__/2008
MP 2	Campo Maior	Ouguela	S	W7° 01' 52.3"	N39° 05' 09.5"	LISI 518/2005
MP 34	Nisa	Montalvão	S	W7.54745	N39.65955	-

(1) S – Silvestre; C – Cultivada.

Os canteiros têm 1,15 m², e encontram-se dispostos em duas filas paralelas no interior de uma estrutura metálica coberta de rede (Fig. 3).



Fig. 3 – Canteiros onde foram plantadas as populações de *Mentha cervina* L. e de *Mentha pulegium* L., aspecto geral do canteiro e pormenor do sistema de rega gota-a-gota (original da autora).

2. Propriedades repelentes/insecticidas do óleo essencial de *Mentha cervina* L.

Com a finalidade de testar as propriedades repelentes/insecticidas do óleo essencial de *M. cervina*, foram realizados dois ensaios, utilizando duas espécies de formigas, *Aphaenogaster senilis* Mayr e *Tapinoma nigerrimum* Nylander, nas quais se procedeu à exposição dos insectos a diferentes concentrações de uma solução do óleo essencial de *M. cervina*.

2.1. Extracção do óleo essencial de *Mentha cervina* L.

A extracção dos óleos essenciais da biomassa seca de *M. cervina* foi realizada por hidrodestilação num aparelho de Clevenger modificado (Fig. 4) no Departamento de Agro-Indústrias e Agronomia Tropical (DAIAT) do ISA. Neste processo, os compostos do óleo essencial são extraídos e volatilizados conjuntamente com vapor de água. Após condensação de vapores forma-se uma fase orgânica (sobrenadante) correspondente aos óleos essenciais, que é recuperada por decantação.

As amostras de material vegetal seco utilizadas no ensaio resultaram da mistura de folhas e inflorescências das populações de *M. cervina* cultivadas na Tapada da Ajuda. O material vegetal seco foi destilado durante 60 minutos. As extracções foram realizadas à pressão atmosférica e à temperatura de ebulição da água (100 °C). O óleo obtido foi guardado num frasco de cor escura, envolvido em papel de alumínio e mantido no frigorífico, para evitar a degradação dos compostos.

A Eng.^a Leandra Rodrigues teve a gentileza de efectuar caracterização química do óleo essencial através de Cromatografia Gás-Líquido (GC) e de Cromatografia Gás-Líquido/Espectrometria de Massa (GC-MS), na Faculdade de Ciências de Lisboa.

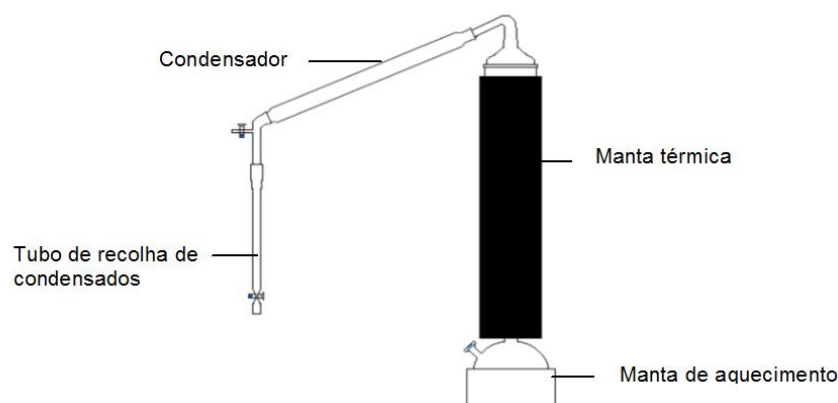


Fig. 4 - Representação esquemática do aparelho de Clevenger modificado (original da autora).

2.2. Soluções de óleo essencial de *Mentha cervina* L.

No estudo relativo à actividade insecticida/repelente dos óleos essenciais de *M. cervina* ensaiaram-se quatro concentrações entre 2,5 e 20,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Quadro 2).

Como solvente, utilizou-se 1% (v/v) de etanol a 96%. Consideraram-se duas testemunhas, uma só com água destilada e outra com água destilada e 1% (v/v) de etanol (96%).

Quadro 2 – Concentrações de óleo essencial de *Mentha cervina* L. utilizadas nos ensaios.

Modalidade	Concentração OE ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
Testemunha (H_2O)	0,0
Testemunha (etanol)	0,0
OE _{2,5}	2,5
OE ₅	5,0
OE ₁₀	10,0
OE ₂₀	20,0

2.3. Obtenção das formigas

As formigas utilizadas nos ensaios foram capturadas através da utilização de armadilhas alimentares (Fig. 5) contendo iscos (atum), entre o final da manhã e o início da tarde, período durante o qual os insectos apresentavam níveis mais elevados de actividade. Este sistema tem como vantagem a utilização de atractivos que permitem capturar elevada quantidade de insectos sem o acompanhamento permanente do operador.

Os insectos capturados pertenciam todos à mesma colónia e foram colocados num recipiente tapado com gaze, de forma a permitir as trocas gasosas, colocado ao abrigo do sol. O transporte para o laboratório foi efectuado o mais rapidamente possível.



Fig. 5 - Armadilhas utilizadas para capturar formigas (originais da autora).

2.4. Ensaio biológico

Grupos de 10 insectos por repetição foram colocados num sistema constituído por dois compartimentos de plástico transparente (Fig. 6), ligados entre si por um tubo de PVC transparente. Num dos compartimentos, foi colocado um atractivo para os insectos, constituído por dois tipos de alimentos, um pedaço de atum e uma solução açucarada embebida num pedaço de algodão. No outro compartimento, foram colocados os insectos de idade e sexo indeterminados, e um pedaço de algodão embebido em água, para evitar a desidratação. Ambas as extremidades foram seladas, com gaze do lado do alimento, de forma a permitir a circulação do ar (sistema aberto), e com *parafilm* na extremidade oposta. Este sistema tinha como objectivo obrigar os insectos a contactar com o OE ao procurar comida. Em cada modalidade foram efectuadas cinco repetições no ensaio realizado com formigas da espécie *A. senilis* e três repetições no ensaio realizado com formigas da espécie *T. nigerrimum*, devido à escassez de exemplares capturados.

Antes da introdução dos insectos, foram aplicados 100 μ l por modalidade de cada concentração da solução de óleo essencial de *Mentha cervina* (Quadro 2), com o auxílio de uma micropipeta, em tiras de papel de filtro com 10 cm². Após a evaporação dos solventes durante 1-3 minutos, as tiras de papel de filtro foram colocadas no interior dos tubos de PVC, através dos quais as formigas teriam acesso ao alimento.

Os parâmetros observados foram a mortalidade e a actividade, em intervalos de 24 horas. O comportamento das formigas foi também observado diariamente, durante cerca de 60 minutos. A actividade foi classificada como baixa, normal, ou elevada, tendo como referência a actividade dos insectos antes de serem introduzidos no sistema.

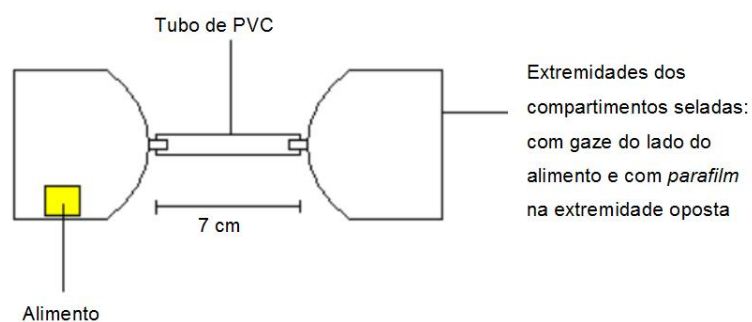


Fig. 6 – Dispositivo experimental utilizado nos ensaios (original da autora).

2.5. Análise estatística e tratamento de dados

Os dados da percentagem de mortalidade obtidos nos dois ensaios foram introduzidos numa folha de cálculo Excel™ e posteriormente submetidos a uma análise de variância (ANOVA). Procedeu-se previamente à transformação logarítmica dos dados ($\log x + 0,5$) para homogeneizar variâncias. A comparação de médias foi feita com base no teste de Tukey. A análise foi efectuada, para cada um dos períodos experimentais, considerando dois tipos de dados: mortalidade acumulada até ao tempo t ; mortalidade ocorrida em cada período de 24 horas. As análises foram efectuadas recorrendo ao programa SPSS versão 15.0.

3. Insectos associados a *Mentha cervina* L.

3.1. Captura, preparação e conservação dos exemplares

Foram seleccionadas 39 populações de *M. cervina* e três populações de *M. pulegium*, oriundas de diferentes zonas do país (Quadro 1). O período de amostragem decorreu nos meses de Julho, Setembro, Outubro e Novembro de 2008, em plantas que se encontravam, respectivamente, nos estados de crescimento 65, 67/69 e 95¹.

A captura de insectos foi efectuada com o auxílio de uma rede de captura, formada por uma manga cónica de tecido resistente, montada sobre um aro metálico ligado a um cabo. Alguns exemplares foram recolhidos para sacos de plástico. Antes de proceder à captura, foi feita uma observação das plantas, nos canteiros, com o objectivo de detectar estragos.

Os espécimes colhidos foram mortos e conservados em etanol a 70%, em tubos de Eppendorf devidamente etiquetados.

Os insectos foram identificados até ao nível da família, com base nas chaves elaboradas por Daly *et al.* (1998). Embora não estando no âmbito do presente trabalho, a Eng.^a Maria dos Anjos Ferreira (INRB) teve a gentileza de identificar os ácaros encontrados até à espécie.

¹ Segundo a Escala BBCH para os estados fenológicos, o estado 65, 67, 69 e 95 correspondem, respectivamente, à floração completa (50%) das flores abertas, primeiras pétalas podem ter caído), à floração no final, fim de floração e senescência (50 % das plantas senescentes) (Hess *et al.*, 1997).

4. Fungos associados a *Mentha cervina* L.

Foram seleccionadas 30 populações de *M. cervina* oriundas de diferentes zonas do país (Quadro 1). A colheita de amostras para o isolamento dos fungos foi efectuada durante os meses de Outubro e Novembro de 2007 (Quadro 3).

Quadro 3 - Identificação das populações estudadas de *Mentha cervina* L. e respectivos estádios de desenvolvimento.

Código ²	Colheita	Estádio de desenvolvimento ³
MC1	18.10.07	67/69
MC2	18.10.07	67/69
MC3	25.10.07	67/69
MC4	25.10.07	67/69
MC5	30.10.07	95
MC6	Sem sintomas ⁴	95
MC7	30.10.07	95
MC8	Sem sintomas	95
MC9	30.10.07	95
MC11	Sem sintomas	95
MC13	02.11.07	95
MC15	02.11.07	95
MC16	02.11.07	95
MC17	Sem sintomas	95
MC18	02.11.07	95
MC19	06.11.07	95
MC20	Sem sintomas	95
MC21	06.11.07	95
MC22	09.11.07	95
MC25	Sem sintomas	95
MC26	Sem sintomas	95
MC28	Sem sintomas	95
MC30	Sem sintomas	95
MC10	09.11.07	95
MC12	Sem sintomas	95
MC14	Sem sintomas	95
MC23	09.11.07	95
MC24	Sem sintomas	95
MC27	Sem sintomas	95
MC29	Sem sintomas	95

² A ordem pela qual os códigos das populações são apresentados corresponde à posição das mesmas nos canteiros.

³ Segundo a Escala BBCH para os estados fenológicos, o estado 67, 69 e 95 correspondem, respectivamente, à floração no final, fim de floração e senescência (50% das plantas senescentes) (Hess *et al.*, 1997).

⁴ As plantas com a designação “sem sintomas” foram excluídas da colheita.

4.1. Observação de sintomas e colheita do material vegetal

Em cada canteiro de *M. cervina*, efectuou-se a descrição sintomatológica das plantas e determinou-se visualmente a percentagem (dois observadores independentes) de plantas secas e com necroses (0% = sem necroses ou sem plantas secas; 100% = todas as plantas com necroses ou secas). Posteriormente, por cada população, colheram-se cinco amostras de plantas com raízes e caules que foram levadas de imediato para o laboratório.

4.2. Estudos laboratoriais das amostras

No laboratório, foram efectuados isolamentos microbiológicos, a partir do material vegetal colhido, com o objectivo de obter isolados dos fungos que eventualmente pudessem estar a afectar as populações de *M. cervina*.

Os caules e raízes foram previamente submetidos a uma lavagem em água corrente durante 24 horas, para retirar toda a terra e minimizar o aparecimento de organismos saprófitas.

Os pedaços de material vegetal foram colocados numa solução desinfectante de hipoclorito de sódio a 1,5%, durante 10 segundos. Seguidamente, foram passados por água destilada esterilizada e secos em papel de filtro. Por fim, foram colocados em meio PDA (*potato dextrose agar*) + KCNS (5%) (tiocianato de potássio) e incubados na obscuridade, à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

A identificação dos fungos foi feita com base nas chaves de Barnett & Hunter (1998).

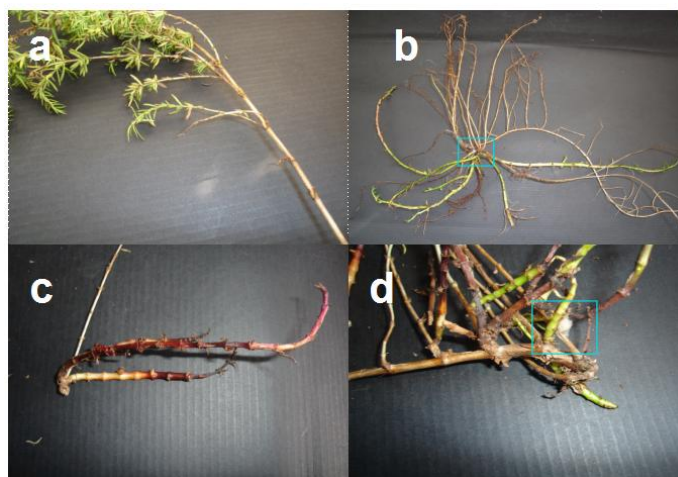


Fig. 7 – Diferentes tipos de sintomas observados em *Mentha cervina* L. : a) Caule de MC2 evidenciando necroses a nível dos entrenós; b) Sistema radicular de MC3 evidenciando presença de micélio; c) Rizoma de MC5 evidenciando cor avermelhada e fendas longitudinais; d) Sistema radicular de MC5 evidenciando presença de micélio (originais da autora).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Propriedades repelentes/insecticidas do óleo essencial em formigas

1.2. Composição do óleo essencial

No óleo essencial (OE), extraído duma mistura de folhas e inflorescências de diversas populações de *M. cervina* cultivadas e colhidas no final do Verão, foram identificados 32 compostos, correspondendo a 81,2% dos compostos presentes (Quadro 4). Os monoterpenos oxigenados foram os constituintes maioritários. A pulegona foi o componente em maior quantidade (47,5%), mas com um valor bastante inferior ao registado noutros estudos com populações silvestres (Rodrigues *et al.*, 2008). A isomentona foi o segundo componente maioritário (16,1%), seguido do limoneno (4,8%). Apenas foram encontrados dois sesquiterpenos, sendo o óxido de β -cariofileno o mais representativo (1%).

1.3. Ensaio

1.3.1. *Tapinoma nigerrimum* Nylander

Ao fim de 24 horas, ocorreu efeito significativo da aplicação do óleo essencial sobre a mortalidade de *T. nigerrimum* ($F_{5,12} = 14,023$; $P < 0,001$) (Anexo A1). As modalidades OE₂₀ e OE₅ diferem significativamente das restantes, todas as restantes não diferem entre si (Fig. 8).

Ao fim de 48 horas, ocorreu efeito significativo da aplicação do óleo sobre a mortalidade de *T. nigerrimum* ($F_{5,12} = 4,859$; $P = 0,012$) (Anexo A1). A modalidade OE₅ é significativamente diferente de OE₁₀, todas as outras não diferem significativamente entre si e de OE₅ e OE₁₀ (Fig. 8).

Ao fim de 72 horas ocorreu efeito significativo da aplicação do óleo sobre a mortalidade de *T. nigerrimum* ($F_{5,12} = 4,017$; $P = 0,023$) (Anexo A1). A modalidade OE_{2,5} difere significativamente das modalidades OE₅ e água destilada. Todas as outras não são significativamente diferentes entre si e de OE_{2,5}, OE₅ e água destilada (Fig. 8).

Ao fim de 96 horas ocorreu efeito significativo da aplicação do óleo sobre a mortalidade de *T. nigerrimum* ($F_{5,12} = 5,254$; $P = 0,009$) (Anexo A1). A modalidade OE_{2,5} é significativamente diferente de OE₅ e água destilada, todas as outras não diferem significativamente entre si e de OE_{2,5}, OE₅ e água destilada (Fig. 8).

Ao fim de 144 horas, ocorreu efeito significativo da aplicação do óleo sobre a mortalidade de *T. nigerrimum* ($F_{5,12} = 5,254$; $P = 0,009$) (Anexo A1). A modalidade OE_{2,5} é significativamente diferente de OE₅ e água destilada, todas as outras não diferem significativamente entre si e de OE_{2,5}, OE₅ e água destilada (Fig. 8).

Quadro 4 - Composição (%) do óleo essencial de *Mentha cervina* L. utilizado no ensaio relativo à toxicidade/repelência em formigas. v: vestigial (<0,05%), (RI - Índice de Retenção).

Componentes	RI	Composto (% p/p)
3-Metil-ciclo-hexanona	914	v
α -Tugeno	924	v
α -Pino	930	0,8
Canfeno	938	v
Sabineno	958	v
3-octanona	961	v
β -Pino	963	1,0
2,5-Dimetil-1-hexeno	970	v
3-Octanol	974	2,5
Mirceno	975	v
<i>p</i> -Cimeno	1003	v
1,8-Cineol	1005	v
Limoneno	1009	4,8
<i>cis</i> - β -Ocimeno	1017	v
<i>trans</i> - β -Ocimeno	1027	v
γ -Terpineno	1035	v
<i>n</i> - Octanol	1045	v
<i>cis</i> -Óxido de linalol	1045	0,4
<i>trans</i>-Óxido de limoneno	1112	v
Mentona	1120	2,8
Isomentona	1126	16,1
Mentofurano	1134	v
<i>cis</i>-Isopulegona	1134	1,9
Terpineno 4-ol	1148	v
Verbenona	1164	0,2
Mirtenol	1168	0,2
Pulegona	1210	47,5
Piperitona	1211	v
Carvotanacetona	1222	0,3
Piperitenona	1289	1,0
Óxido de β -Cariofileno	1561	1,0
Epóxido de humuleno	1579	0,7
% Identificação		81,2

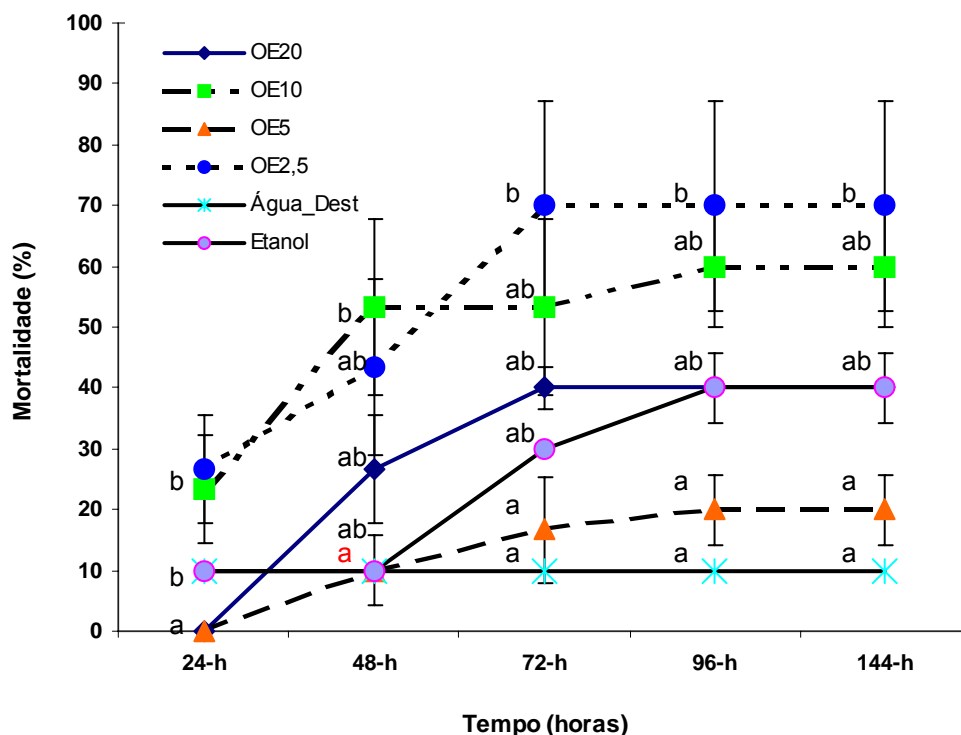


Fig. 8 – Taxa de mortalidade (%) (\pm erro padrão) ocorrida ao longo de 144 horas em todas as modalidades, no ensaio realizado com *Tapinoma nigerrimum* Nylander.

Em relação à actividade, observou-se que as formigas da modalidade testemunha apresentaram actividade normal durante o ensaio e circulavam entre compartimentos.

Foram observados três tipos de actividade: baixa, normal e elevada. Na modalidade OE₂₀ (Fig. 9), após a montagem do sistema, a maioria dos insectos evidenciou actividade bastante elevada, circulando entre compartimentos com grande agitação. Este tipo de comportamento prolongou-se até às 24 horas. Ao longo do ensaio verificou-se que as formigas que evidenciaram elevada actividade tinham atravessado o tubo sem paragens no interior do mesmo, e as formigas com baixa actividade se encontravam principalmente no interior do tubo, ou junto do acesso a este. As formigas que permaneceram no interior do tubo durante um período de tempo superior a cerca de 1 minuto baixaram o nível de actividade. As formigas com actividade normal concentravam-se no compartimento de partida, aproximando-se com frequência das menos activas, e esfregando as antenas. Algumas formigas que se encontravam no compartimento do alimento, que evidenciavam actividade elevada, concentravam-se sobre a gaze que separava o compartimento do exterior, tendo sido este tipo de comportamento observado até às 72 horas. No intervalo de 96 horas, a maioria das formigas encontrava-se no compartimento do alimento com elevada actividade ou no interior do tubo com baixa actividade. Apenas algumas formigas se encontravam no compartimento de partida, apresentando actividade normal. Ao fim de 144 horas, a maioria das formigas encontrava-se no compartimento de partida com actividade normal.

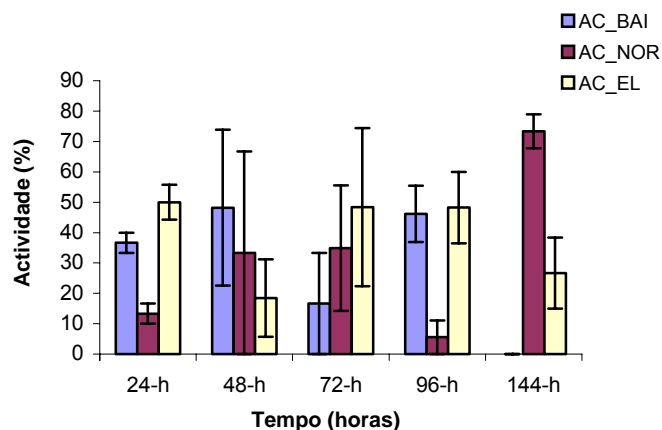


Fig. 9 – Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE₂₀ ao longo de 144 h no ensaio realizado com *Tapinoma nigerrimum* Nylander.

Na modalidade OE₁₀ (Fig. 10), a seguir à montagem do ensaio, observou-se um aumento de actividade e concentração dos insectos à entrada do tubo, no compartimento de partida. Após um período de aproximadamente duas horas, verificou-se que algumas formigas começaram a atravessar o tubo. Ao fim de 24 horas, algumas formigas encontravam-se no compartimento de partida, com actividade normal. Neste intervalo, observou-se também que a maioria das formigas se encontrava no compartimento do alimento com actividade elevada, junto à gaze que separava o compartimento do exterior, no interior do tubo, ou na saída do lado do alimento, depois de terem permanecido algum tempo no seu interior (igual ou superior a cerca de 1 minuto), evidenciando baixa actividade. No intervalo de 48-72 horas, a maioria das formigas encontrava-se no compartimento de partida, com actividade normal. Neste intervalo de tempo, a maior parte das formigas com baixa actividade encontravam-se junto do acesso ao tubo. No intervalo de 96 horas, a maioria das formigas encontrava-se no interior do tubo ou junto do acesso a este, com baixa actividade. Ao fim de 144 horas, aumentou o número de formigas no compartimento de partida com actividade normal. As restantes encontravam-se junto do acesso ao tubo ou no compartimento de partida, com baixa actividade. Observou-se interacção com o alimento durante alguns períodos de observação.

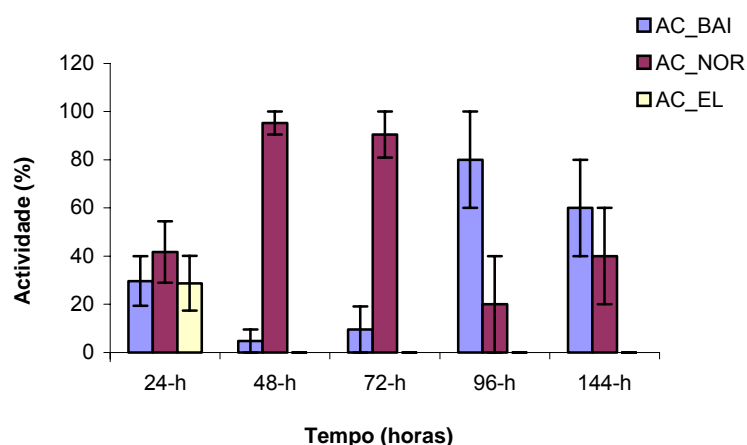


Fig. 10 - Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE₁₀ ao longo de 144 h no ensaio realizado com *Tapinoma nigerrimum* Nylander.

Na modalidade OE₅ (Fig. 11), no período de observação seguinte à montagem do ensaio, verificou-se que a maioria das formigas permanecia no compartimento de partida. Algumas aproximavam-se do acesso ao tubo, ou tentavam iniciar a travessia, acabando por voltar para trás. No intervalo de 24 horas, a maioria das formigas encontrava-se no compartimento de partida, com actividade normal. Neste período de observação, verificou-se que a maioria das formigas tentava aceder ao tubo, acabando por regressar ao compartimento de partida. Algumas conseguiram permanecer alguns minutos na entrada, evidenciando um decréscimo no nível de actividade, e outras acabaram por atravessar o tubo. No intervalo de 48 horas, algumas formigas conseguiram iniciar a travessia do tubo, mas a maioria acabou por regressar ao compartimento de partida, evidenciando um aumento de actividade. No intervalo de 72-96 horas, as formigas concentraram-se no compartimento de partida, aproximando-se esporadicamente do acesso ao tubo, acabando por voltar para trás, algumas atravessaram o tubo. Na observação efectuada ao fim de 144 horas, verificou-se que a maioria das formigas se encontrava no compartimento de partida e as restantes entraram no tubo, mas nem todas passavam para o compartimento do alimento. As formigas que permaneceram junto do acesso ao tubo evidenciaram uma diminuição da actividade.

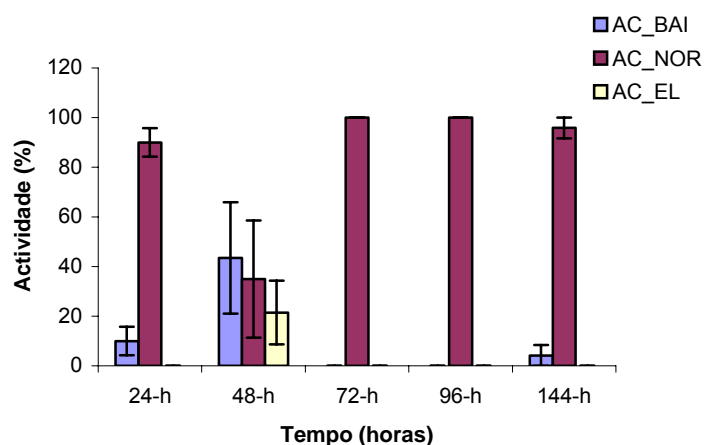


Fig. 11 - Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE₅ ao longo de 144 h no ensaio realizado com *Tapinoma nigerrimum* Nylander.

Na modalidade OE_{2,5} (Fig. 12), após a montagem do sistema de compartimentos, as formigas concentraram-se no compartimento de partida durante cerca de 15 minutos, altura em que começaram a circular entre compartimentos, com actividade normal. Algumas formigas que tentaram atravessar o tubo voltavam para trás. Ao fim de 24 horas, as formigas continuaram a circular entre compartimentos, a maioria encontrava-se no interior do tubo ou no compartimento do alimento, aproximando-se do isco, com baixa actividade. As restantes encontravam-se no compartimento de partida. No intervalo de 48 horas o comportamento foi semelhante ao observado no dia anterior. No intervalo de 72 horas, as formigas que apresentaram baixa actividade encontravam-se no compartimento do alimento. A maioria das formigas com actividade normal encontrava-se no compartimento de partida. No intervalo de 96 horas, a maioria das formigas circulava entre compartimentos, com actividade normal. Observou-se também que algumas formigas se aproximavam com frequência do alimento. Ao fim de 144 horas, a maioria das formigas continuou a circular entre compartimentos com actividade normal, e as restantes apresentavam baixa actividade.

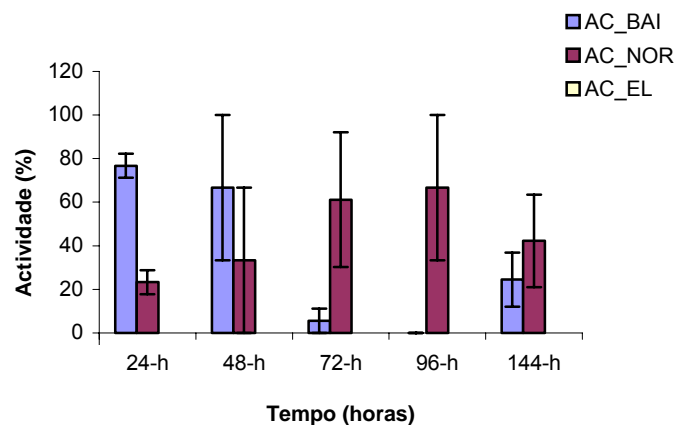


Fig. 12 - Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE_{2,5} ao longo de 144 h no ensaio realizado com *Tapinoma nigerrimum* Nylander.



Fig. 13 - Concentração de formigas da espécie *Tapinoma nigerrimum* Nylander no compartimento de partida (original da autora).

Em relação às observações feitas a nível comportamental, é de salientar a elevada interactividade entre as formigas que apresentavam actividade normal e aquelas cuja actividade era baixa. Observou-se uma aproximação frequente das formigas cuja actividade era normal às mais debilitadas, permanecendo junto destas durante curtos períodos de tempo, esfregando as antenas.

1.3.2. *Aphaenogaster senilis* Mayr

Ao fim de 24 horas, ocorreu efeito significativo da aplicação do óleo essencial sobre a mortalidade de *A. senilis* ($F_{5,24} = 16,258$; $P < 0,001$) (Anexo A2). A modalidade OE_{2,5} difere significativamente das restantes. Todas as outras não diferem significativamente entre si (Fig. 14).

Ao fim de 48 horas, ocorreu efeito significativo da aplicação do óleo sobre a mortalidade de *T. nigerrimum* ($F_{5,24} = 23,376$; $P < 0,001$) (Anexo A2). A modalidade OE_{2,5} é significativamente diferente de OE₂₀, sendo ambas significativamente diferentes das restantes. Todas as outras não diferem significativamente entre si (Fig. 14).

Ao fim de 72 horas, ocorreu efeito significativo da aplicação do óleo sobre a mortalidade de *A. senilis* ($F_{5,24} = 25,820$; $P < 0,001$) (Anexo A2). A modalidade OE_{2,5} é significativamente diferente de OE₂₀, sendo ambas significativamente diferentes das restantes. Todas as outras não diferem significativamente entre si (Fig. 14).

Ao fim de 96 horas, ocorreu efeito significativo da aplicação do óleo sobre a mortalidade de *A. senilis* ($F_{5,24} = 20,076$; $P < 0,001$) (Anexo A2). As modalidades OE₂₀ e OE₅ diferem significativamente de OE_{2,5} e das restantes. Todas as outras não diferem significativamente entre si (Fig. 14).

Ao fim de 144 horas, ocorreu efeito significativo da aplicação do óleo sobre a mortalidade de *A. senilis* ($F_{5,24} = 34,878$; $P < 0,001$) (Anexo A2). As modalidades OE₂₀ e OE₅ diferem significativamente de OE_{2,5} e das restantes. Todas as outras não diferem significativamente entre si (Fig. 14).

Ao fim de 168 horas, ocorreu efeito significativo da aplicação do óleo sobre a mortalidade de *A. senilis* ($F_{5,24} = 70,866$; $P < 0,001$) (Anexo A2). As modalidades OE₂₀ e OE₅ diferem significativamente de OE_{2,5} e das restantes. Todas as outras não diferem significativamente entre si (Fig. 14).

Ao fim de 192 horas, ocorreu efeito significativo da aplicação do óleo sobre a mortalidade de *A. senilis* ($F_{5,24} = 80,951$; $P < 0,001$) (Anexo A2). As modalidades OE₂₀ e OE₅ diferem significativamente de OE_{2,5} e das restantes. Todas as outras não diferem significativamente entre si (Fig. 14).

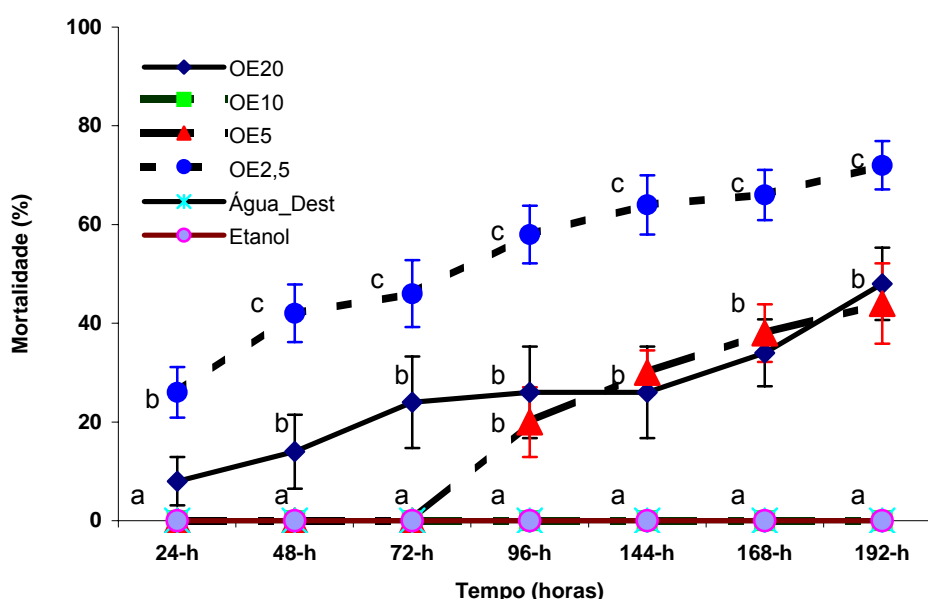


Fig. 14 - Taxa de mortalidade (%) (\pm erro padrão) ocorrida ao longo de 192 horas em todas as modalidades no ensaio realizado com *Aphaenogaster senilis* Mayr.

Após a montagem do sistema, verificou-se que as formigas na testemunha começaram a circular entre compartimentos, evidenciando actividade normal até ao final do ensaio.

Na modalidade OE₂₀ (Fig. 15), após a montagem do ensaio, as formigas evidenciaram um grande aumento de actividade e começaram a circular entre compartimentos. Ao fim das primeiras 24 horas, verificou-se um decréscimo no nível de actividade em relação ao início do ensaio. Observou-se também que algumas das formigas com baixa actividade se encontravam no interior do tubo. Ainda neste intervalo de tempo, verificou-se que as formigas com elevada actividade circulavam entre compartimentos, atravessando o tubo directamente, sem paragens. Estas formigas, ao entrarem no compartimento do alimento, concentravam-se sobre a gaze que separava o compartimento do exterior ou interagiam com o alimento. No intervalo de 48 horas, as formigas com actividade elevada concentraram-se de novo sobre a gaze. Algumas interagiram com o alimento. As formigas que se encontravam no compartimento de partida evidenciaram actividade normal, mas a maioria circulava entre compartimentos, com baixa actividade. No intervalo de 72-144 horas predominou a baixa actividade e a circulação das formigas entre compartimentos. No intervalo de 168 horas, a maioria das formigas encontrava-se no compartimento de partida com actividade normal, e as restantes encontravam-se no compartimento do alimento, evidenciando baixa actividade. No intervalo de 192 horas, as formigas continuaram a circular entre compartimentos, mas a maioria encontrava-se concentrada no compartimento de partida. Neste período de observação, a actividade manteve-se normal.

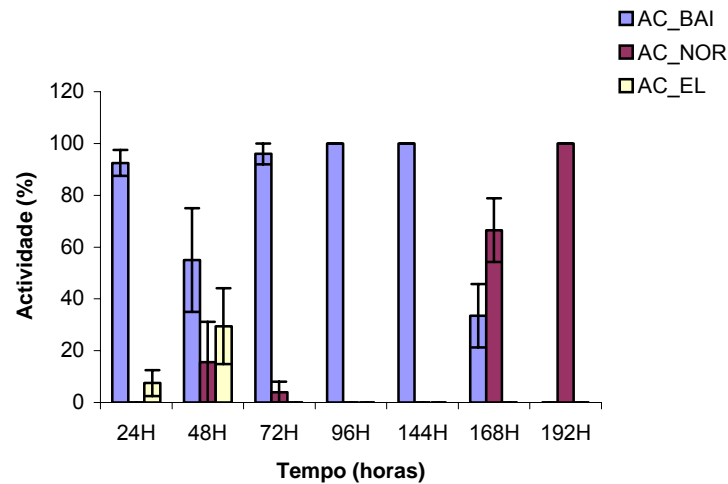


Fig. 15 - Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE₂₀ ao longo de 192 h no ensaio realizado com *Aphaenogaster senilis* Mayr.

Na modalidade OE₁₀ (Fig. 16), após a montagem do ensaio, as formigas evidenciaram um aumento de actividade, e mantiveram-se no compartimento de partida. No final do intervalo de 24 horas, todos os insectos apresentavam actividade normal. Neste período de observação, a maioria das formigas encontrava-se no compartimento de partida, algumas aproximavam-se da abertura do tubo, acabando por voltar para trás. No intervalo de 48 horas, as formigas encontravam-se no compartimento de partida, com actividade normal, recuando cada vez que se aproximavam do acesso ao tubo. Observou-se também que algumas formigas conseguiram passar através da entrada do tubo, permanecendo imóveis durante alguns minutos, acabando por regressar ao compartimento de partida, esfregando as antenas e evidenciando baixa actividade. No intervalo de 72 horas, as formigas concentraram-se no compartimento de partida, sem fazerem qualquer tentativa de aproximação à entrada do tubo. Este tipo de comportamento repetiu-se até ao final do ensaio, com actividade normal.

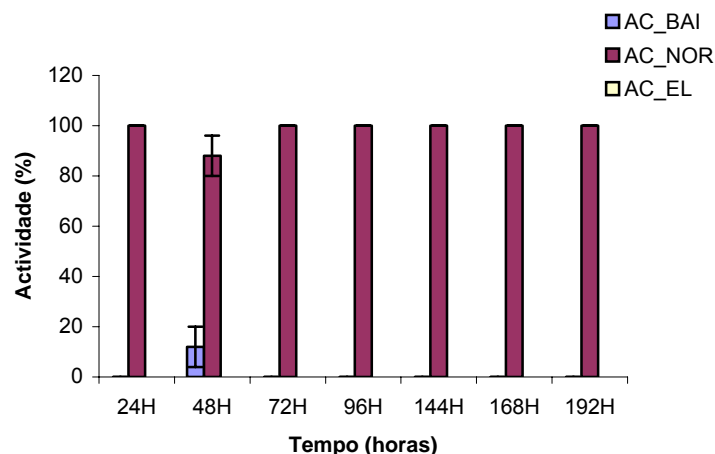


Fig. 16 - Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE₁₀ ao longo de 192 h no ensaio realizado com *Aphaenogaster senilis* Mayr.

Na modalidade OE₅ (Fig. 17), no intervalo de 24 horas, as formigas encontravam-se no compartimento de partida, e aquelas que se aproximavam da entrada do tubo voltavam para trás, com actividade normal. No intervalo de 48 horas, algumas formigas conseguiram entrar na abertura do tubo, permanecendo alguns minutos no seu interior, acabando por regressar ao compartimento de partida, com baixa actividade. As restantes, que se encontravam no compartimento de partida, mantiveram actividade normal. No intervalo de 48 horas, algumas formigas conseguiram entrar na abertura do tubo, permanecendo alguns minutos no seu interior, regressando ao compartimento de partida, e evidenciando baixa actividade. No intervalo de 72 horas, as formigas estavam concentradas no compartimento de partida, e após várias tentativas para atravessar o tubo, algumas começaram a circular entre compartimentos, interagindo com o alimento. Este tipo de comportamento manteve-se até ao final do ensaio (192 horas). Relativamente às observações efectuadas durante o ensaio, é de salientar que no intervalo de 144 horas, numa das repetições desta modalidade, as formigas retiraram a tira de papel de filtro, deslocando-a para o compartimento de partida, e começaram a circular entre compartimentos, aproximando-se do alimento. No intervalo de 168 horas, noutra repetição da mesma modalidade, as formigas também deslocaram a tira de papel de filtro para o interior do compartimento de partida. Até ao final do ensaio, as formigas que retiraram o papel de filtro do interior do tubo circulavam com maior frequência entre compartimentos relativamente às das outras repetições da mesma modalidade.

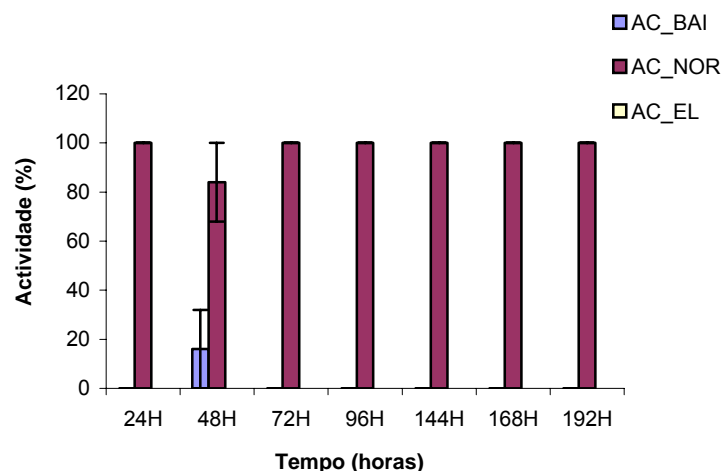


Fig. 17 - Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE₅ ao longo de 192 h no ensaio realizado com *Aphaenogaster senilis* Mayr.

Na modalidade OE_{2,5} (Fig. 18), após a montagem do ensaio, as formigas permaneceram no compartimento de partida durante cerca de 30 minutos, começando a circular entre compartimentos. Nas primeiras 24 horas, as formigas circulavam entre compartimentos evidenciando baixa actividade. No intervalo de 48 horas, verificou-se que grande parte das formigas se concentrava no compartimento de partida, com actividade normal, mas a maioria continuava a circular entre compartimentos. Observou-se também um decréscimo de actividade, à medida que as formigas atravessavam o tubo. A partir do intervalo de 72 horas até ao final do ensaio, as formigas continuaram a circular entre compartimentos, com baixa actividade. Durante os períodos de observação, verificou-se que existia interacção com o alimento.

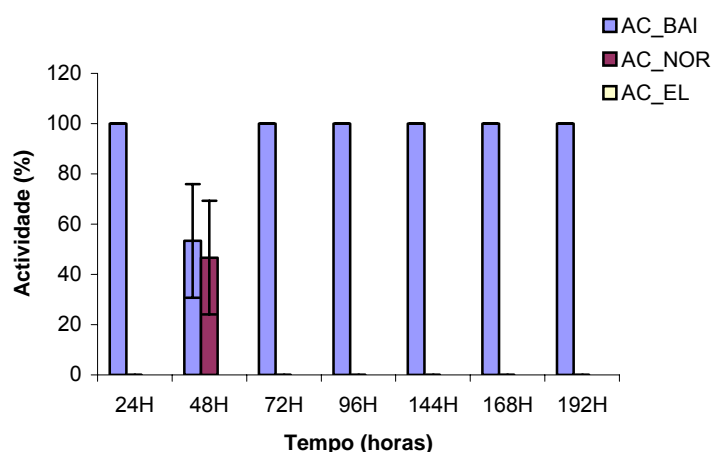


Fig. 18 - Nível médio de actividade (%) (\pm erro padrão) observado para a modalidade OE_{2,5} ao longo de 192 h no ensaio realizado com *Aphaenogaster senilis* Mayr.

Em termos comportamento, verificou-se que estas formigas interagem pouco entre si, relativamente à espécie *T. nigerrimum*.

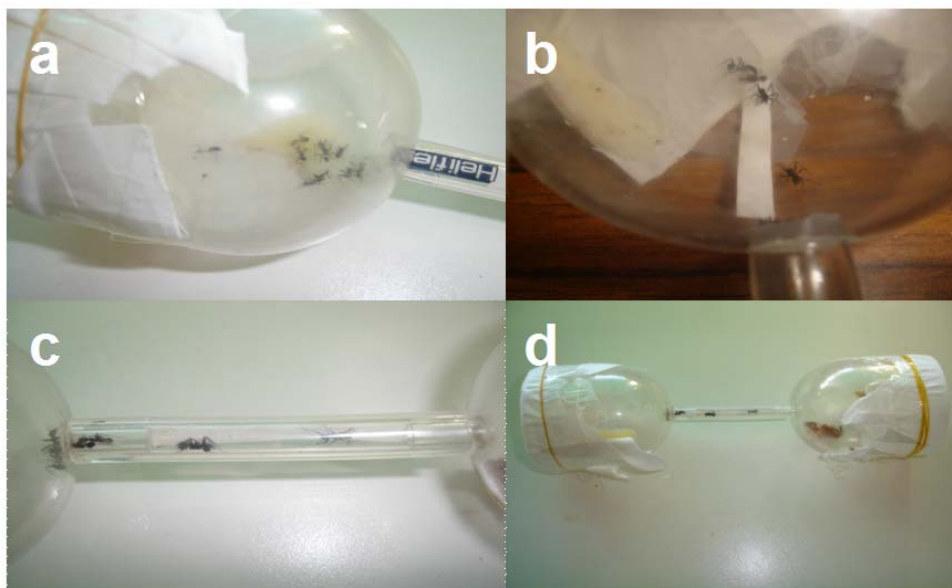


Fig. 19 – a) Concentração de formigas da espécie *Aphaenogaster senilis* Mayr no compartimento de partida em OE₅ (72 horas); b) formigas a retirarem o papel de filtro do interior do tubo na modalidade OE₅; C): formigas a atravessarem o tubo na modalidade OE_{2,5}; d): dispositivo experimental (originais da autora).

1.3.3. Discussão global

Os resultados obtidos parecem indicar que existe um efeito de mortalidade devido ao OE. No entanto, existe a possibilidade de algumas formigas terem morrido na sequência da interacção com o alimento, o que poderá ter influenciado de alguma forma os resultados finais. Para além deste aspecto, há que considerar o carácter preliminar do presente estudo, e portanto, os resultados obtidos não podem ser conclusivos, pois seria necessário efectuar mais ensaios para verificar a consistência dos mesmos. No entanto, é possível colocar algumas hipóteses explicativas para os resultados obtidos.

A percentagem de mortalidade mais baixa (0%) foi registada na modalidade OE₁₀, no estudo realizado com formigas da espécie *A. senilis*. Neste caso, de acordo com as observações efectuadas, é possível afirmar que este resultado poderá ter sido devido ao efeito de repelência causado pelos compostos voláteis do OE libertados, que aparentemente foram detectados pelas formigas, que evitaram contactar com a superfície tratada, mantendo-se no compartimento de partida. A única excepção observada ocorreu no intervalo de 48 horas, no qual algumas formigas conseguiram permanecer algum tempo na entrada do tubo, acabando por voltar para trás, esfregando as antenas.

Este tipo de comportamento poderá ter sido devido à volatilização dos compostos constituintes do OE. Aparentemente, na modalidade OE₅ ainda na mesma espécie, ocorreu um efeito de repelência que teve a duração de aproximadamente 72 horas, altura em que as formigas começaram a atravessar o tubo, contactando com a superfície tratada. Este resultado poderá ter sido devido à volatilização dos compostos voláteis, que deixaram de estar presentes numa concentração detectável pelas formigas. Num estudo efectuado por Saljoqi *et al.* (2006), acerca do efeito dos extractos vegetais em *Sitophilus oryzae* L. em trigo armazenado, verificou-se que o efeito repelente do extracto de *Mentha longifolia* (L.) Huds. se manteve durante 6 dias, tendo sofrido um decréscimo ao longo do tempo, a partir do segundo dia.

No ensaio realizado com *T. nigerrimum*, os resultados obtidos na modalidade OE₁₀ foram bastante diferentes dos obtidos em *A. senilis*. Neste caso, é possível afirmar que existem diferenças entre as espécies relativamente à sensibilidade aos compostos voláteis que provocam efeito de repelência (na ausência de outros factores). No entanto, em relação à modalidade OE₅ verificou-se a ocorrência de algum efeito repelente, mas menos evidente do que o observado em *A. senilis*, pois neste caso, algumas formigas atravessavam o tubo e outras não conseguiram fazê-lo. De acordo com estes resultados, parecem existir diferenças dentro da mesma espécie em relação à sensibilidade aos compostos voláteis responsáveis pelo efeito repelente. Essas diferenças encontradas poderão ter sido devidas a diversos factores, como por exemplo, a idade e o estado fisiológico das formigas, uma vez que não se conhece o historial dos indivíduos.

Os valores de mortalidade mais elevados registados no ensaio realizado com formigas da espécie *A. senilis* pertencem às modalidades OE_{2,5}, OE₅ e OE₂₀ (72%, 44% e 48% de mortalidade, respectivamente), enquanto no ensaio realizado com formigas da espécie *T. nigerrimum*, esses valores foram observados nas modalidades OE_{2,5}, OE₁₀ e OE₂₀ (70%, 60% e 40% de mortalidade, respectivamente). Estes resultados seriam de esperar, tendo em conta o efeito de repelência já discutido observado nas restantes modalidades. Num estudo acerca das propriedades insecticidas de alguns óleos essenciais em *Musca domestica* L., realizado por Pavela (2007), concluiu-se que o óleo de *M. pulegium* (com 83,3% de pulegona na sua constituição), foi dos mais eficazes em termos de efeito insecticida, tendo sido o mais eficaz no teste de fumigação, no qual foi utilizada uma concentração de 4,7 µg/cm². Com base nos referidos resultados, é possível colocar a hipótese de ter ocorrido mortalidade devido ao efeito de fumigação, principalmente nas modalidades em que as concentrações de OE eram mais elevadas e que desencadearam o aumento de actividade das formigas após a aplicação, aparentemente numa tentativa de fuga. No entanto, há que considerar o facto de ter sido utilizado um sistema aberto na realização do presente trabalho, o que poderá ter causado uma diminuição da eficácia do efeito fumigante. Outro aspecto a ter em conta é a concentração de pulegona no óleo de *M. cervina*, que apesar de ser o composto maioritário do OE utilizado neste estudo, se encontra presente com um valor bastante inferior (47,5%) ao registado em estudos feitos por outros autores com plantas silvestres, o que poderá também ter influenciado os valores de mortalidade obtidos.

Ainda em relação à mortalidade, o facto dos valores de mortalidade registados em OE_{2,5}, em ambos os ensaios, terem sido superiores aos da modalidade OE₂₀ parece contraditório, tendo em

conta apenas os valores das concentrações das referidas modalidades. No entanto, é de salientar que na modalidade OE_{2,5} as formigas circulavam constantemente entre compartimentos, contactando com a superfície tratada. Na modalidade OE₂₀, verificou-se que as formigas que apresentavam actividade elevada atravessavam o tubo sem fazerem paragens no interior. De acordo com Peterson & Coats (2001), a volatilidade é considerada essencial à actividade repelente fazendo com que os insectos reduzam o seu tempo de permanência na superfície tratada. Portanto, no que respeita ao possível efeito exercido pelo OE na mortalidade, estes resultados poderão ter sido devidos ao efeito de toxicidade por contacto prolongado exercida sobre as formigas da modalidade OE_{2,5}, e que poderá ter sido menos eficaz nas formigas da modalidade OE₂₀, devido ao efeito de repelência, que as impediu de contactar com a superfície tratada durante longos períodos de tempo. Relativamente ao efeito repelente, parecem existir dois tipos de resposta em função da concentração de OE encontrada. Em algumas das concentrações mais elevadas, a resposta das formigas traduziu-se pelo aumento de actividade, numa aparente tentativa de fuga, possivelmente devido à grande concentração de compostos voláteis constituintes do OE, que se propagaram até ao compartimento de partida. No caso do efeito repelente observado nas concentrações mais baixas, a resposta das formigas foi dada no sentido de evitar o contacto com a zona tratada.

De acordo com Pavela (2007), para além do impacto directo dos óleos essenciais e das substâncias que os constituem na mortalidade, considerado como sendo o factor mais importante, existem factores secundários relevantes, tais como o efeito a nível do desenvolvimento, da fertilidade, repelência e fago-inibição, que devem ser referidos, apesar de alguns não se encontrarem no âmbito do presente trabalho.

2. Insectos associados a *Mentha cervina* L.

No levantamento dos insectos associados a *M. cervina* e *M. pulegium*, foram identificados 604 indivíduos, englobando quatro ordens, 12 famílias e 23 espécies (Quadro 5, figuras 23 e 24). Foram também identificados ácaros em 12 das populações de *M. cervina*, englobando 2 ordens, 4 famílias e 4 espécies (Quadro 6).

Relativamente aos ácaros encontrados, foram observados sinais da sua presença (teias). De acordo com a Eng.^a Maria dos Anjos Ferreira (comunicação pessoal), *Tetranychus ludeni* Zacher é uma espécie fitófaga importante, enquanto *Brevipalpus* sp., também fitófago, tem importância variável consoante as plantas hospedeiras, podendo algumas vezes não desenvolver grandes populações. Os acarídeos são, fundamentalmente, micetófagos ou saprófagos e os *Agistemus* sp. predadores. De acordo com Rezk (2001), a espécie *Brevipalpus obovatus* Donnadieu (Acari: Tenuipalpidae) tem como principais hospedeiros os citrinos e as mentas. Em relação a *Brevipalpus* sp. e a *T. ludeni*, podemos afirmar que estamos perante potenciais pragas de espécies de *Mentha*.

No Quadro 5 apresentam-se os insectos capturados e a distribuição dos mesmos pelas respectivas ordens e famílias.

Quadro 5 – Insectos identificados, populações onde foram capturados/observados, órgãos onde foram observados (1 = Caules; 2 = Folhas; 3 = Inflorescências; (+) = maior incidência) e número de exemplares capturados (continua).

Ordem	Superfamília	Família	Código da espécie	Populações onde os insectos foram capturados/observados*	Órgão(s) Vegetais	N.º de exemplares capturados
Coleoptera	Chrysomeloidea	Bruchidae	SP3	MC (11, 12)	1, 2	4
		Chrysomelidae ⁽¹⁾	SP2	MC (+) e MP	1, 2	57
	Curculionoidea	Scolytidae	SP5	MC (1, 2, 3)	2	3
	Histeroidea	Histeridae	SP4	MC8	1, 2	2
	Staphylinoidea	Staphylinidae	SP6	MC (3, 19, 20, 24)	2	4
	Tenebrionoidea	Mordellidae	SP1	MC (1-30) e MP	1, 2	48
Diptera	Agromyzoidea	Clusiidae	SP18	MC (1, 2, 3, 4, 5)	2	5
	Anthomyzoidea	Heleomyzidae	SP20	MC (1, 2, 3, 4, 5, 9, 11)	2	7
	Muscoidea	Anthomyidae	SP19	MC (1, 3, 4, 5)	2	6
	Phoroidea	Phoridae	SP17	MC (10, 36, 43) e MP2	2, 3	5
Hemiptera	Cicadelloidea	Cicadellidae	SP12	MC e MP (+)	2	55
			SP13	MC e MP	2	67

⁽¹⁾ Género: *Longitarsus*

Quadro 5 – (continuação) Insectos identificados, populações onde foram capturados/observados, órgãos onde foram observados (1 = Caules; 2 = Folhas; 3 = Inflorescências; (+) = maior incidência) e número de exemplares capturados.

Ordem	Superfamília	Família	Código da espécie	Populações onde os insectos foram capturados/observados*	Órgão(s) Vegetais	N.º de exemplares capturados
Hemiptera	Cicadelloidea	Cicadellidae	SP14	MC e MP	2	63
			SP15	MC (1, 4, 7, 21, 29)	2	11
			SP16	MC1	2, 3	8
	Cimicoidea	Anthocoridae	SP7	MC (+) e MP	1, 2, 3	120
		Miridae	SP8	MC (+) e MP	2, 3	62
			SP10 ⁽¹⁾	MC9 e MP2	1	5
			SP11	MC e MP (+)	2, 3	45
	Fulgoroidea	Dictyopharidae	SP9	MC (14, 19, 20, 21)	2	8
	Apoidea	-	SP22	MC e MP (+) *	3	10
			SP23	MC e MP (+) *	3	5
	Ichneumonoidea	Ichneumonidae	SP21	MC (4, 5, 7)	3	3

⁽¹⁾ Ninfa

Quadro 6 – Ácaros identificados em *Mentha cervina* L.

Ordem	Família	Gênero/espécie	Populações
Astigmata	Acaridae	-	MC (4, 13, 19)
Prostigmata	Tenuipalpidae	<i>Brevipalpus</i> sp.	MC (4, 5, 7, 9, 10, 13, 19, 21, 25, 27, 28)
	Tetranychidae	<i>Tetranychus ludeni</i>	MC12
	Stigmaeidae	<i>Agistemus</i>	MC (4, 10)

A maioria dos insectos capturados pertence às ordens Coleoptera (20%) e Hemiptera (73%) (Fig. 20).

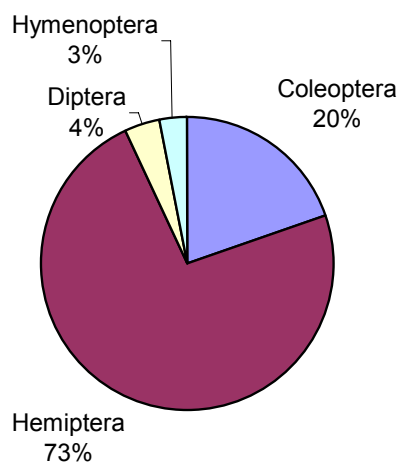


Fig. 20 – Percentagem de insectos capturados distribuídos pelas respectivas ordens.

Foram observadas folhas roídas e necroses em plantas de *M. cervina* e de *M. pulegium* e caules roídos e cloroses em plantas de *M. cervina* (Fig. 21).



Fig. 21 – Estragos observados em *Mentha cervina* L. (MC) e *Mentha pulegium* L. (MP) provocados por insectos: a) Folhas roídas (MC); b) caule e folhas roídas (a rosa) e necrose das folhas (a azul) (MC); c) plantas com cloroses (MC); d) Folhas roídas e com necroses (MP) (originais da autora).

A presença de teias de aranha nos canteiros era muito abundante, provavelmente relacionada com a presença abundante de insectos.

Observou-se a presença de gafanhotos em diversos canteiros (Fig. 22), não só das populações estudadas como também de outras plantas cultivadas nas proximidades. Verificou-se que estes insectos se alimentavam também de folhas e caules de *M. cervina* e de folhas de *M. pulegium*, ocasionalmente.



Fig. 22 – Gafanhoto adulto (original da autora).

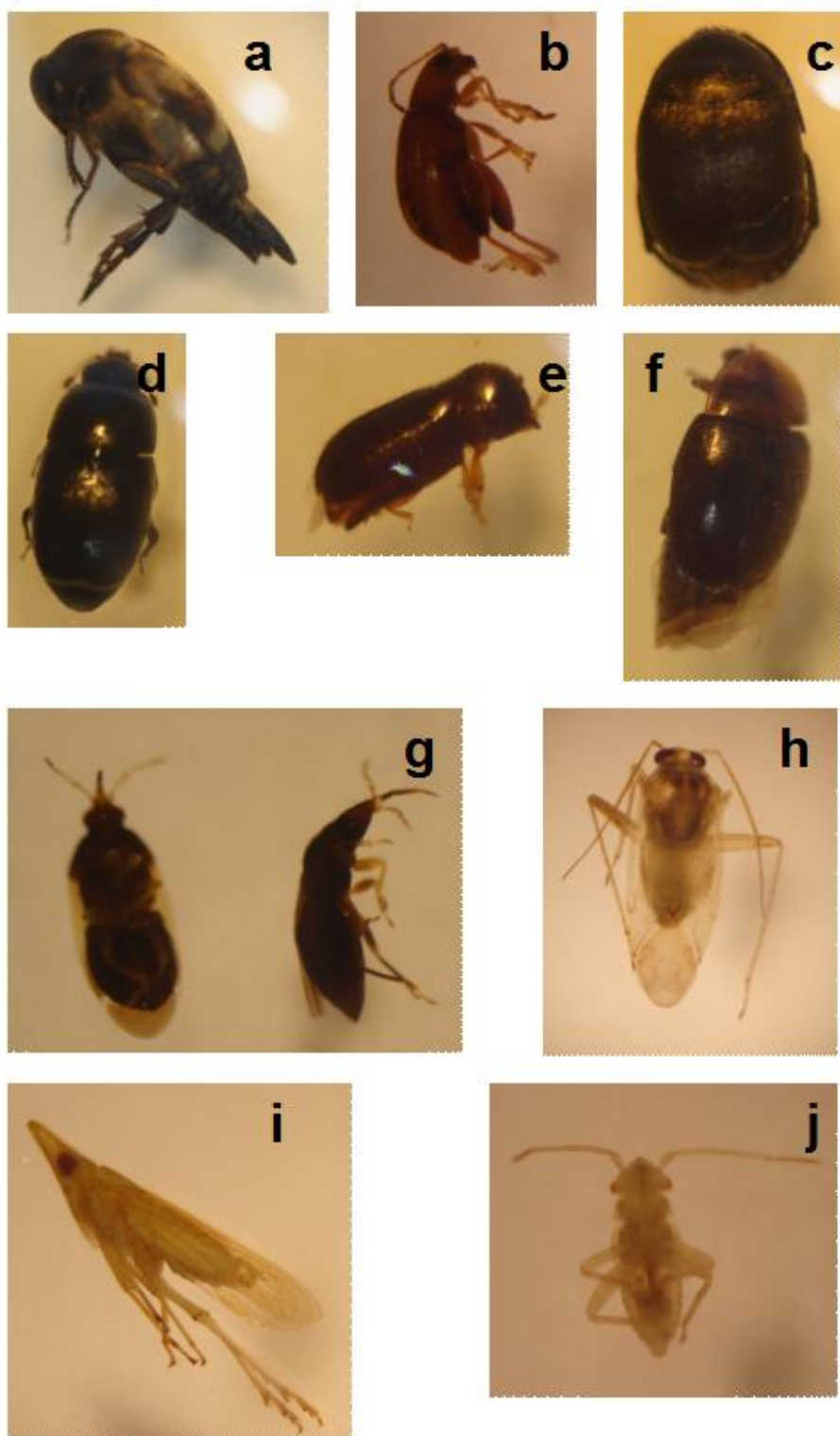


Fig. 23 - Insectos identificados no presente estudo. Coleoptera: a) SP1; b) SP2; c) SP3; d) SP4; e) SP5; f) SP6; Hemiptera: g) SP7; h) SP8; i) SP9; j) SP10 (originais da autora).

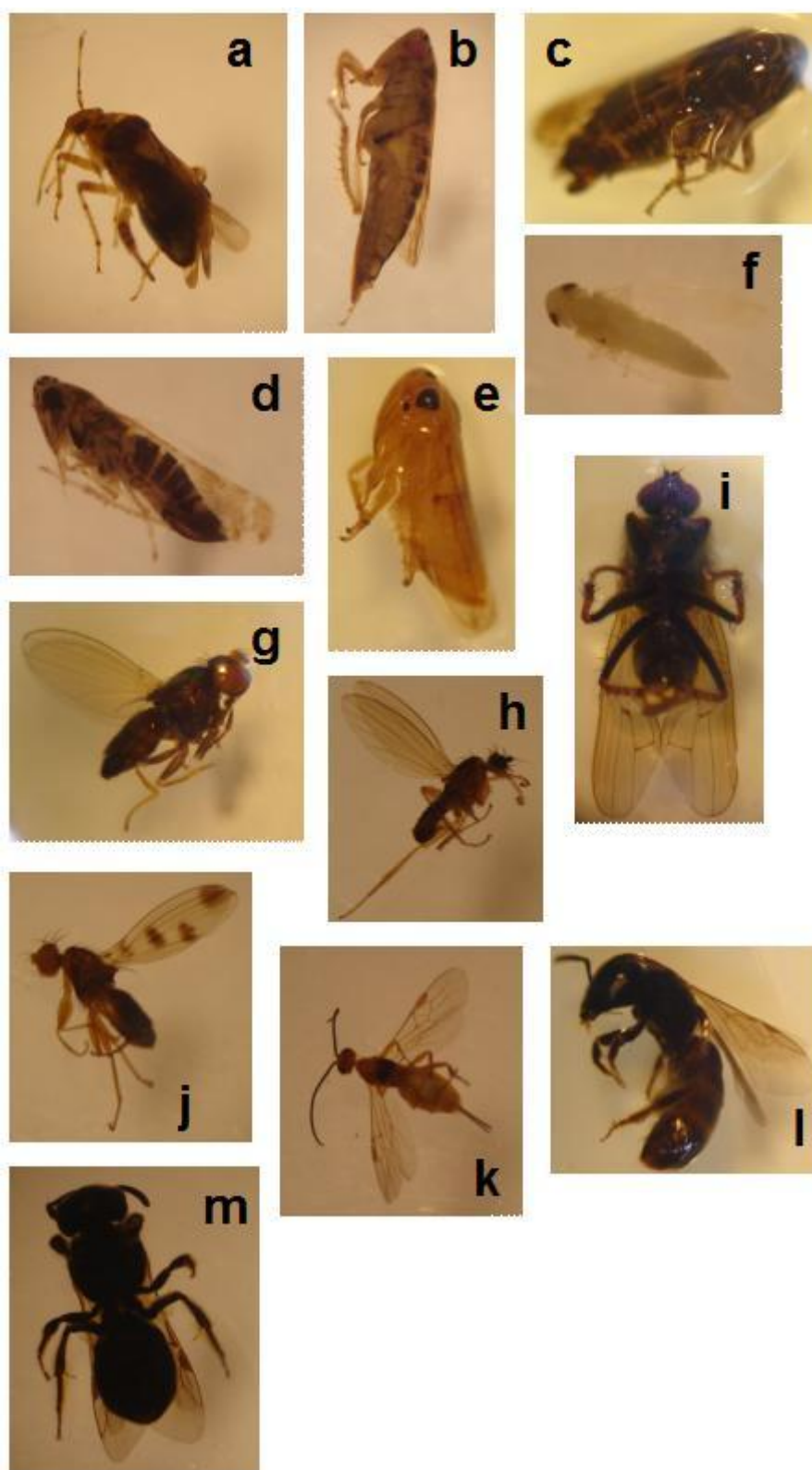


Fig. 24 - Insetos identificados no presente estudo. Hemiptera: a) SP11; b) SP12; c) SP13; d) SP14; e) SP15; f) SP16; Diptera: g), SP17; h) SP18; i) SP19; j) SP20; k); Hymenoptera: SP21: l) SP22: m) SP23) (originais da autora).

A espécie SP1 (Coleoptera: Mordellidae), foi encontrada com abundância em grande parte das populações de *Mentha* estudadas, durante o mês de Julho. Não foi detectada actividade alimentar. Observou-se também que estes insectos formavam grupos nos caules (3-5 indivíduos), mas também foram observados indivíduos solitários.

A espécie SP2 (Coleoptera: Chrysomelidae) foi observada em todas as populações estudadas de *M. pulegium* e de *M. cervina*, com maior incidência sobre esta última. A sua presença parece estar associada ao aparecimento de pequenos orifícios na superfície das folhas.

Não foram observados sinais de actividade alimentar relacionados com as espécies SP3, SP4 (Coleoptera: Histeridae), SP5 (Coleoptera: Scolytidae) e SP6 (Coleoptera: Staphylinidae).

SP7 (Hemiptera: Anthocoridae) foi a espécie capturada em maior número. Através da observação à lupa binocular, verificou-se a formação de aglomerados nas extremidades dos caules, por vezes de 5-7 indivíduos. Raramente foram observados indivíduos solitários.

SP8 (Hemiptera: Miridae) encontra-se entre os insectos capturados em maior número. Verificou-se que esta espécie se encontrava presente com elevada densidade sobre as populações de plantas estudadas e também nas plantas em redor.

Em relação a SP9 (Hemiptera: Dictyopharidae), verificou-se que estes insectos apareciam com alguma frequência sobre *M. cervina* e ocasionalmente, sobre *M. pulegium*.

SP10 é uma ninfa, provavelmente relacionada com uma das espécies de mirídeos observada, constituindo evidência de que ocorreu reprodução.

SP11 (Hemiptera: Miridae) encontram-se entre os insectos capturados em maior número. Verificou-se que esta espécie se encontra presente em grande número sobre as plantas, não só das populações estudadas, como noutras plantas em redor.

SP12, SP13 e SP14 (Hemiptera: Cicadellidae) encontram-se entre os insectos capturados em maior número. Verificou-se que existiam em grande número sobre *M. cervina* e de *M. pulegium*, mas também noutras plantas em redor.

Os únicos exemplares observados de SP15 e SP16 (Hemiptera: Cicadellidae) foram os capturados. O mesmo foi verificado em relação a SP17 (Diptera: Phoridae), SP18, SP19, SP20 e SP21 (Hymenoptera: Ichneumonidae).

As espécies SP22 (Hymenoptera: Apoidea) e SP23 (Hymenoptera) foram observadas sobre inflorescências de *M. cervina*, mas também em *M. pulegium*, onde eram claramente mais abundantes.

De uma forma geral, é possível afirmar que não existe grande diversidade em termos de ordens identificadas e, dentro dessas ordens, alguns insectos não parecem estar relacionados com as plantas estudadas. Contudo, relativamente a SP1, embora não tenham sido detectados sinais de actividade alimentar, a abundância da espécie nas plantas estudadas levou a considerar o possível relacionamento da presença destes insectos com a presença da cultura. Tucker & Naczi (2006) referem coleópteros pertencentes à família Mordellidae como polinizadores de espécies pertencentes ao género *Mentha* na Nova Zelândia. Embora não tenha sido observada a presença destes insectos nas inflorescências, os resultados sugerem que estamos na presença de potenciais polinizadores de

M. cervina e de *M. pulegium*. O mesmo parece ser aplicável em relação aos himenópteros SP22 e SP23, que foram observados apenas durante o período em que as plantas se encontravam em floração, mas não foram feitas observações relativamente a flores de outras plantas em redor.

A espécie SP2 (Coleoptera: Chrysomelidae) foi identificada como pertencente ao género *Longitarsus*, ao qual pertence uma das espécies referidas na bibliografia da especialidade como pragas de *Mentha*. Neste caso, podemos afirmar que estamos perante uma praga potencial de espécies de *Mentha*.

As manchas cloróticas observadas em *M. cervina* (Fig. 21c) parecem estar associadas à presença de cicadelídeos, enquanto as manchas necróticas de pequenas dimensões (Fig. 21b) parecem estar associadas à presença de mirídeos. Segundo Rung *et al.* (2009), a espécie *Eupteryx decemnotata* Rey (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae) é conhecida como praga de diversas plantas da família *Lamiaceae*, incluindo o género *Mentha*. Estes autores referem, ainda, que as populações destes insectos atingem grandes dimensões na Europa, causando grandes estragos.

A presença de antocorídeos nas plantas estudadas poderá estar relacionada com outros grupos de insectos ou ácaros, uma vez que estes insectos são predadores.

3. Fungos associados a *Mentha cervina* L.

No estudo dos fungos associados à espécie *M. cervina*, verificaram-se algumas diferenças entre as populações em cultura na Tapada da Ajuda (Quadro 7).

Quadro 7 – Percentagem de plantas de *Mentha cervina* L. secas ou com necroses.

População	(%)
MC1	20
MC2	20
MC3	50
MC4	75
MC5	10
MC7	10
MC9	<5
MC10	20
MC13	10
MC15	10
MC16	10
MC18	90
MC19	20
MC21	20
MC22	10
MC23	10

No Quadro 8 referem-se os diversos tipos de sintomatologia resultantes da presença de fungos em *M. cervina* em cultura. Nas populações MC1, MC2, MC3, MC4, MC5, MC7, MC10, MC13, MC15, MC16, MC18, MC21 e MC22, identificaram-se algumas plantas sãs e outras totalmente secas e desprovidas de folhas, nas quais se constatou um enegrecimento a nível das raízes e/ou do caule. Nas populações MC2, MC15 e MC16, amostraram-se também necroses na base e na intersecção dos raminhos.

Foram observados caules avermelhados em várias populações. Nas populações MC3, MC9 e MC19 ainda se observaram folhas avermelhadas e na MC23 algumas folhas secas aderentes ao caule (Fig. 25).

O apodrecimento da raiz foi observado em MC7, MC10 e MC22.



Fig.25 - Folhas e caules de *Mentha cervina* L. com avermelhamento (original da autora).

Quadro 8 - Presença (S) ou ausência (N) de plantas secas ou com necroses de diferentes populações de *Mentha cervina* L. nos canteiros.

População	Plantas secas	Necroses dos caules	Necrose das raízes
MC1	S	S	S
MC2	S	S	S
MC3	N	N	S
MC4	S	N	S
MC5	N	N	S
MC7	N	N	S
MC9	N	N	N
MC10	S	N	S
MC13	S	S	S
MC15	S	S	S
MC16	S	S	N
MC18	S	N	S
MC19	S	N	N
MC21	N	N	S
MC22	N	N	S
MC23	S	N	N

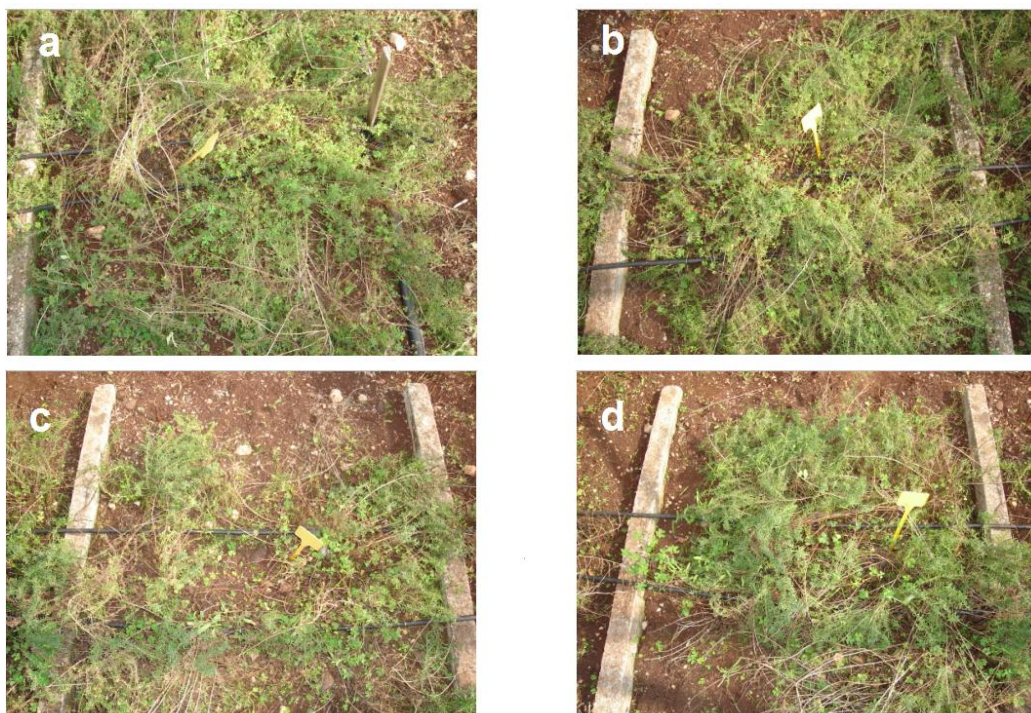


Fig. 26 – Aspecto dos canteiros de *Mentha cervina* L.: a) MC1; b) MC2; c) MC3; d) MC4 (originais da autora).



Fig. 27 – Aspecto dos canteiros de *Mentha cervina* L. : a) MC5; b) MC7; c) MC9; d) MC10 (originais da autora).

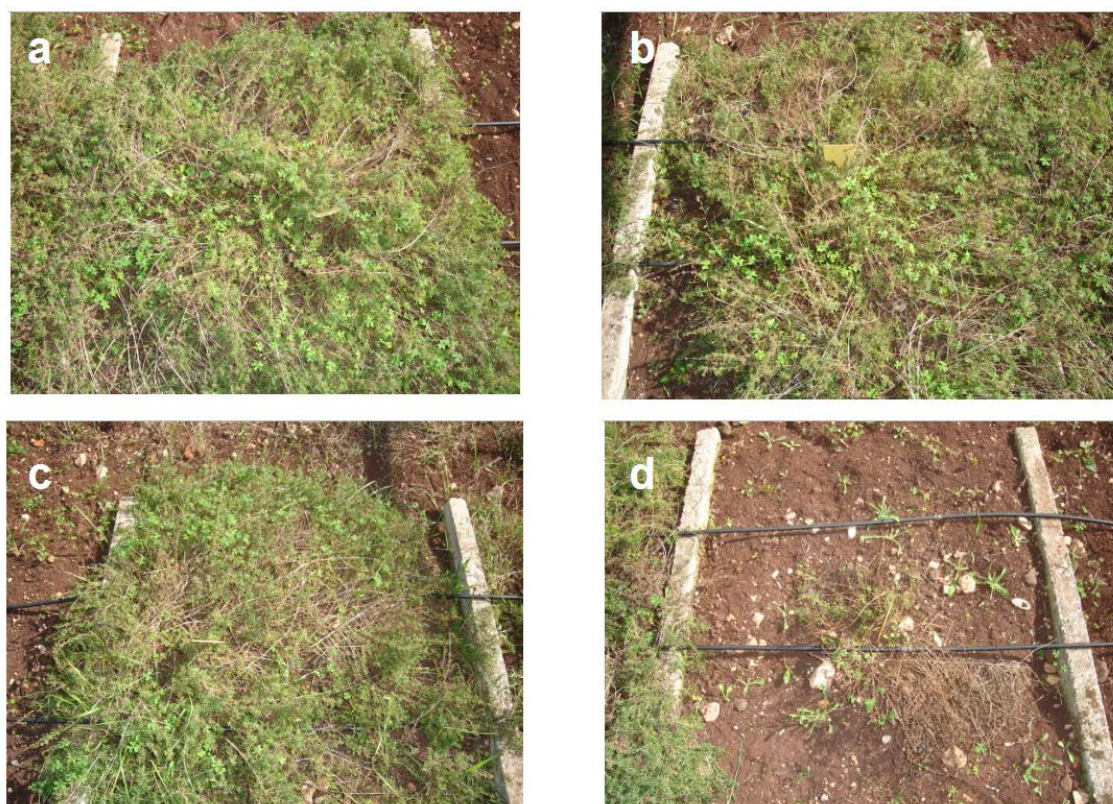


Fig. 28 – Aspecto dos canteiros de *Mentha cervina* L. : a) MC13; b) MC15; c) MC16; d) MC18 (originais da autora).

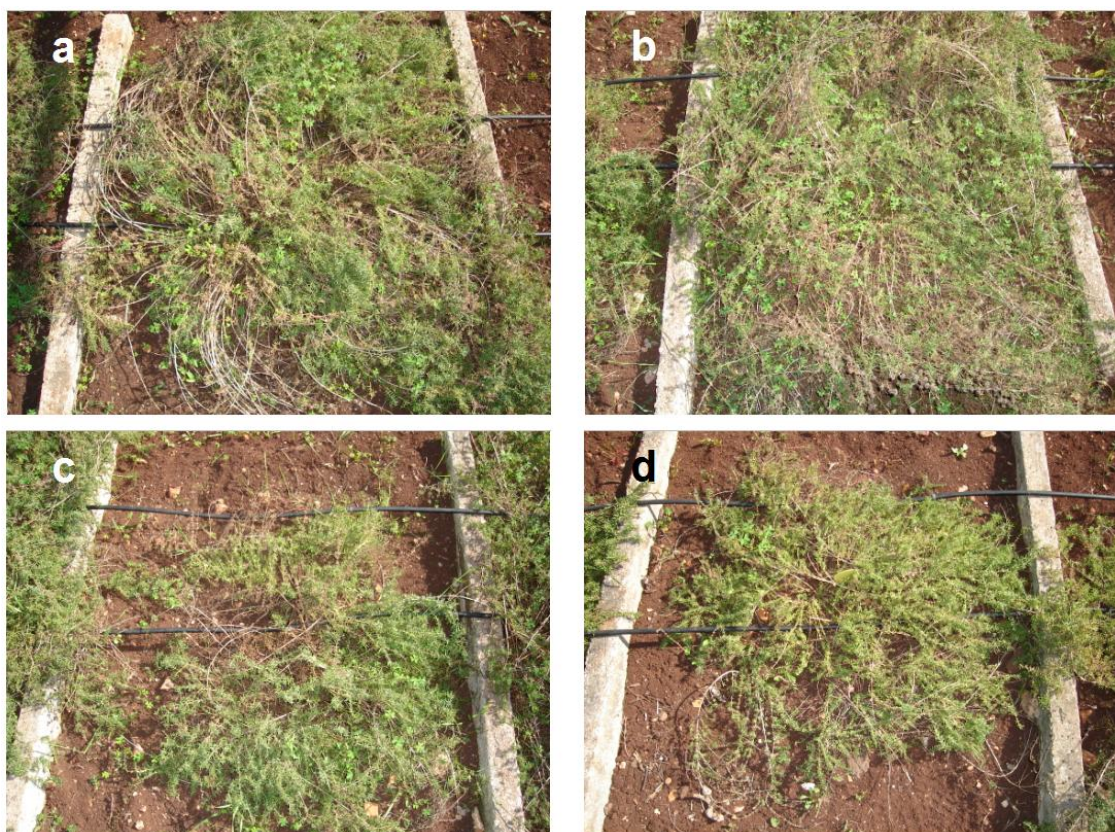


Fig. 29 -Aspecto dos canteiros de *Mentha cervina* L. : a) MC19; b) MC21; c) MC22; d) MC23 (originais da autora).

Nas populações em estudo identificaram-se fungos dos géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cylindrocarpon*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Sclerotinia*, *Scytalidium* e *Trichoderma*.

A maioria dos fungos pertencia aos géneros *Alternaria* e *Fusarium*, presentes respectivamente em 93,8% e 62,5% de populações de *Mentha* (Fig. 30).

Os fungos dos géneros *Alternaria*, *Fusarium* e *Trichoderma* foram isolados quer na raiz, quer no caule das plantas, os dois primeiros em diversas populações e o último em MC7 e MC 18. Os fungos que foram identificados, apenas, no caule de algumas plantas pertencem aos géneros *Aspergillus* (MC5, MC22), *Cylindrocarpon* (MC13) e *Sclerotinia* (MC18). Todos os outros géneros foram registados, apenas, na raiz de diferentes populações (Quadro 9).

O fungo *Colletotrichum coccodes* foi também referenciado por Johnson (2002) em caules e raízes assintomáticas de *Mentha x piperita*.

Conclui-se que a maior percentagem de plantas com sintomas pertence aos canteiros MC3, MC4 e MC18, todas provenientes do Alentejo.

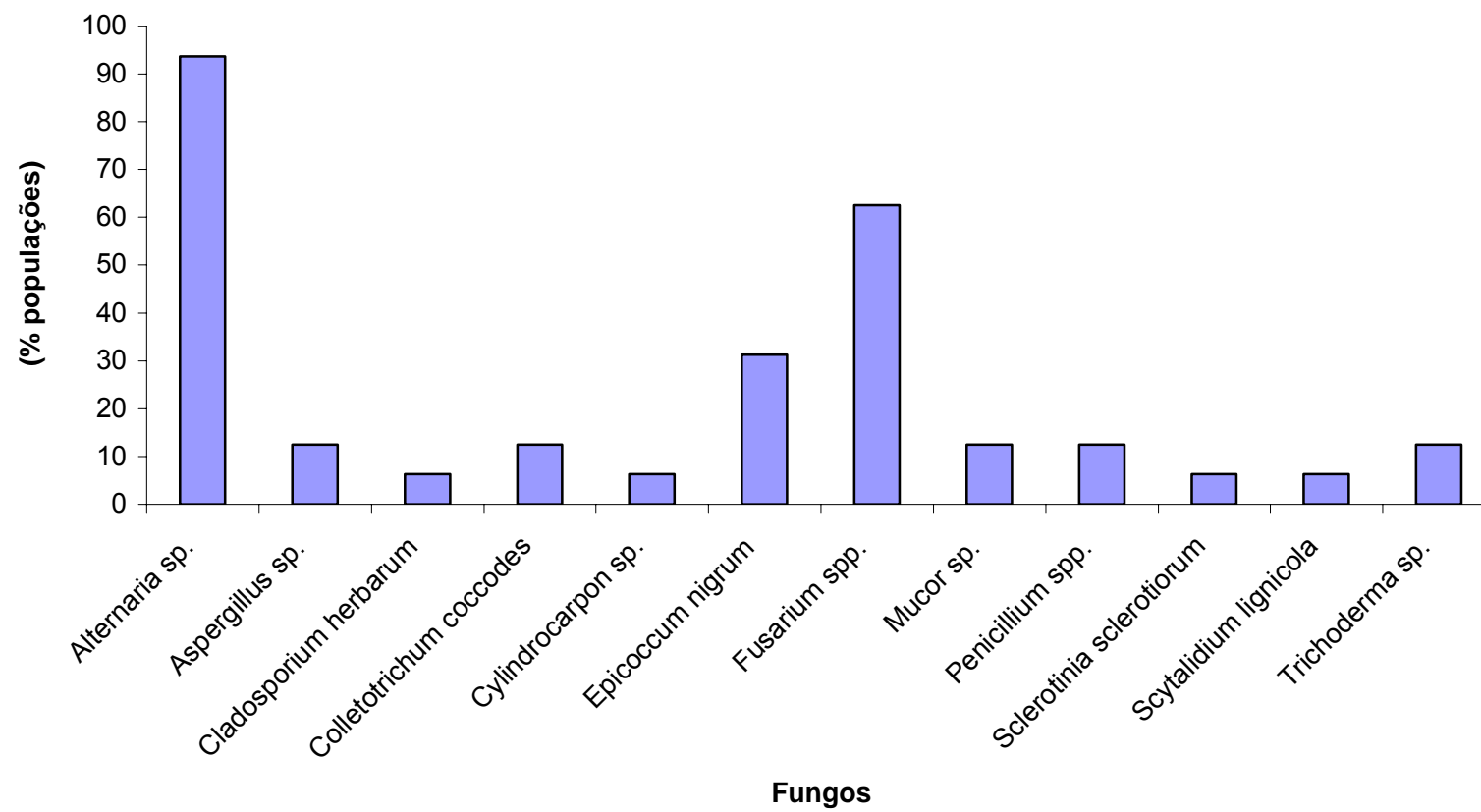


Fig. 30 – Fungos identificados nas populações de *Mentha cervina* L..

Quadro 9 – Fungos presentes por população e por órgão vegetal de *Mentha cervina* L. (C – caule, R – raiz).

População de <i>Mentha cervina</i>	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.*	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Colletotrichum coccodes</i> (*)	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	<i>Epicoecum nigrum</i>	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Mucor</i> sp.*	<i>Penicillium</i> spp*	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Scytalidium lignicola</i> *	<i>Trichoderma</i> sp.*
MC1	R					R	R	R			R	
MC2	C						R					
MC3	R							R				
MC4	R					R						
MC5	C/R	C	R			R						
MC7	C/R			R		R	C/R					C
MC9	R					R	C/R					
MC10	C/R						R					
MC13					C		C					
MC15	C/R								R			
MC16	C						R					
MC18	C									C		R
MC19	C/R						C					
MC21	C						C/R					
MC22	C/R	C		R								
MC23	C/R						R		R			

(*) Isolados em raízes sem sintomas.

* Fungos saprófitas

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As propriedades repelentes/insecticidas dos óleos essenciais de plantas aromáticas têm vindo a ser estudadas por diversos autores, alguns dos quais são referidos neste trabalho, contudo, existem ainda aspectos por explorar, o que torna este tema num interessante objecto de estudo.

A utilização de produtos de origem natural como alternativa aos pesticidas sintéticos tem vindo a assumir importância devido à crescente preocupação em termos ambientais e de saúde pública, no entanto, é necessário chamar a atenção para o facto de não existir uma garantia de inocuidade das substâncias apenas por terem sido originadas na natureza.

Apesar de os resultados obtidos terem carácter preliminar, suscitam importantes questões, tais como o efeito do óleo essencial sobre outros grupos de insectos economicamente importantes, a durabilidade do efeito do óleo (ou seja, as condições e o período de conservação), o efeito do óleo em condições de campo (vs. condições *in vitro*), o efeito da volatilização dos compostos do OE na duração do efeito insecticida, entre outras, que poderão ser aprofundadas em estudos futuros.

Este trabalho deu um contributo para o conhecimento de insectos associados às plantas de *M. cervina* e de *M. pulegium* no nosso país. Algumas espécies, segundo a literatura, estarão presentes pelo facto de serem polinizadores. Enquanto outras (Coleoptera: Chrysomelidae; Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae) poderão ser potenciais pragas do género *Mentha*.

A presença de antocorídeos nas plantas estudadas poderá estar relacionada com outros grupos de insectos ou ácaros, uma vez que estes insectos são predadores. O facto é que se observou uma densidade populacional elevada.

Justificam-se, por isso, trabalhos futuros de identificação das espécies de insectos presentes nos poejeiros em cultura.

O trabalho evidenciou também a presença de diversos fungos associados às plantas de *M. cervina* no nosso país, estudo que até à data não tinha sido efectuado. Embora não estando no âmbito do presente trabalho efectuar estudos acerca da patogenicidade dos isolamentos obtidos, podemos contudo concluir que estamos em presença de fungos potencialmente patogénicos, tais como *Alternaria* sp., *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum* que são referidos na bibliografia da especialidade como fungos patogénicos para espécies de *Mentha*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou, E.E.N. (2001). Insecticidal activity of some essential oils: cAMP mediates effect. *Bull High Inst Public Health Univ. Alexandria Egypt*, 31:15 - 30
- Agnihotri, V.K., Agarwal, S.G., Dhar, P.L., Thappa, R.K., Baleshwar, Kapahi, B.K., Saxena, R.K., Qazi, G.N. (2005). Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour and Fragrance J.*, 20: 607-610
- Agosti, D. & Collingwood, C.A. (1987). A provisional list of the Balkan ants (Hym. Formicidae) with a key to the worker caste. II. Key to the worker caste, including the European species without the Iberian. *Bulletin de la Soc. entomol. Suisse*, 60: 261-293
- Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. Fifth edition. Elsevier academic press, Oxford.
- Almeida, D.(2006). *Manual de Culturas Hortícolas*. p.133-138. Editorial Presença, Lisboa.
- Arnason, J.T., Durst, T., Philogène, B.J.R. (2002). Prospection d'insecticides phytochimiques des plantes tempérées et tropicales communes ou rares. In: *Biopesticides d'Origine Végétale*. Regnault-Roger, C., Philogène, B.J. & Vincent, C. (coord.). p. 41-49. Editions TEC&DOC, Paris.
- Bacon, J.P., Thompson, K.S.J. & Stern, M. (1995). Identified octopaminergic neurons provide an arousal mechanism in the locust brain. *J. Neurophysiol.*, 74: 2739-2743
- Bartnett, H.L. & Hunter, B.B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Fourth Edition. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Baumann, E., Gersh, M. (1982). Purification and identification of neurohormone D, a heart accelerating peptide from the corpora cardiaca of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.*, 12: 7-14
- Bento, F.M.M., Magro, S.R., Fortes, P., Zério, N.G., Parra, J.R.P. (2007). Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Agrotis ipsilon* em dieta artificial. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília*, 42: 1369-1372
- Berry, R. (2007). Application and evaluation of entomopathogens for control of pest insects in mint. In: *Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and other Invertebrate Pests*. Lacey LA, Kaya HK (Eds.). p. 599-607. Springer, U.S.A.
- Berry, R.E. and Fisher, G. (1993). A guide to peppermint insect and mite identification and management, *PNW Bulletin* 182. p. 37 Oregon State University, Corvallis.
- Bhat, R.G. & Subbarao, K.V. (1999). Host Range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathol.*, 89: 1218-1225
- Bhat, S., Maheshwari, P., Kumar, S. & Kumar, A. (2002). *Mentha* species: In vitro Regeneration and Genetic Transformation. *Molec. Biol. Today*, 3 : 11-23
- Bienvenu, F. (2002). Integrated Pest Management in Peppermint Growing in South East Australia. Disponível em: <https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/02-127.pdf> (Acedido em Janeiro 2008)
- Blackshaw, R.P. & Petrovskii, S.V. (2007). Limitation and Regulation of Ecological Populations: a Meta-analysis of *Tipula paludosa* Field Data. *Math. Model. Nat. Phenom.*, 2: 46-62.

- Blackshaw, R.P. & Petrovskii, S.V. (2007). *Tipula paludosa* population dynamics: challenging the myth of environmental limitation. In: Proceedings of the Meeting OILB/SROP Working group "Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes"/Subgroup "Soil Insect Pests". Auer (Itália) 16-18 Outubro 2006. Jürg Enkerli (Ed.). Bulletin OILB srop, 30: 13
- Blenau, W. & Baumann, A. (2001). Molecular and Pharmacological Properties of Insect Biogenic Amine Receptors: Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochem. and Physiol.*, 48: 13-38
- Bobev, S.G., Margina, A. F., de Gruyter, J. (2002). First Report of *Phoma strasseri* as a Pathogen of *Stachys officinalis* in Bulgaria. *Plant dis.*, 86: 699
- Boulay, R., Soroker, V., Godzinska, E.J., Hefetz, A., Lenoir, A. (2000). Octopamine reverses the isolation-induced increase in trophallaxis in the carpenter ant *Camponotus fellah*. *The J. of Exper. Biol.*, 203: 513-520
- Brunel, E. (1989). Les insectes In: Ennemis et Maladies des Prairies. Maladies – Ravageurs et parasites animaux. Plantes Parasites. Troubles de la nutrition. Raynal, G., Gondran, J., Bournoville, R., Courtillot, M. (Eds.) p. 153-169. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris.
- Capinera, J.L. (2001). *Handbook of Vegetable Pests*. Academic Press, Londres.
- Chippendale, G.M. (1978). The functions of carbohydrates in insect life process In: *Biochemistry of Insects*. Rockstein M (ed.) p. 19-53. Academic Press, Londres.
- Collingwood, C. & Prince, A. (1998). *A guide to Ants of Continental Portugal* (Hymenoptera: Formicidae). Suplemento nº 5. Buletim da Sociedade Portuguesa de Entomologia. Lisboa.
- Cusinato, O., Wheeler, C.H., Goldsworthy, G.J. (1991). The identity and physiological actions of adipokinetic hormone in *Acheta domesticus*. *J. Insect Physiol.*, 37: 461-469
- D'Antuono, L.F. & Elementi, S. (2006). Facts and Perspectives of Edible *Lamiaceae*: Flavour and Health, Industrial Exploitation, and the Consumer. In Proceedings of the First International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilization. C. Cervelli, B. Ruffoni, C. Dalla Guda (eds.). Sanremo, Italy, February 22-25. *Acta Horticulturae*, 723: 33-40
- Daly, H.V., Doyen, J.T., Purcell III, A.H. (1998). *Introduction to Insect Biology and Diversity*. p. 570-600. Oxford University Press, Oxford .
- Davis, E.E. (1985). Insect repellents: concepts of their mode of action relative to potential sensory mechanisms in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. of Med. Entomol.*, 22: 237-243
- Degen, J., Gewecke, M., Roeder, T. (2000) Octopamine receptors in the honey bee and locust nervous system: pharmacological similarities between homologous receptors of distantly related species. *British J. of Pharmacol.*, 130: 587-594
- Delahaut, K. A., (1999). Crop Profile for Mint in Wisconsin. Prepared: January, 1999. Disponível em: <http://www.ipmcenters.org/cropprofiles/docs/wimint.pdf> (Acedido em Fevereiro 2008).
- Ducrot, P– H. (2002). Contribution de la chimie à la compréhension de l'activité biopesticide de produits naturels d'origine végétale. In: *Biopesticides d'Origine Végétale*. Regnault-Roger, C., Philogène, B.J. & Vincent, C. (coord.). 53-63 p. Editions TEC&DOC, Paris.

- Dudai, Y., Buxbau, J., Corfas, G.G. & Ofarim, M. (1987). Formamidines interact with *Drosophila* octopamine receptors alter the flies behaviour and reduce their learning ability. *J. Comp. Physiol.*, 161A: 739-746
- Enan, E.E. (1998). Insecticidal action of terpenes and phenols to the cockroaches: effect on octopamine receptors. *Int. Symp. Crop Prot. Ghent*, May 5-10. Belgium.
- Enan, E.E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminogenic sites of action. *Cop. Biochem. Physiol. Part. C*, 130:325-337
- Enan, E.E. (2005). Molecular and Pharmacological Analysis of an Octopamine Receptor From American Cockroach and Fruit Fly in Response to Plant Essential Oils. In: *Archives of Insect Biochem. and Physiol.*, 59: 161-171
- Evans, P.D. (1981). Multiple receptor types for octopamine in the locust. *J. Physiol.*, 319: 99-122
- Farr D., Bills G.F., Chamuris G.P. & Rossman A.Y., 1989. *Fungi on plants and plant products in the United States*. p. 1252. APS Press. St. Paul p.
- Fauna Europaea Web Service (2004) Fauna Europaea version 1.1, Disponível em: <http://www.faunaeur.org> (Acedido em Setembro 2008)
- Fenemore, P.G. (1984). *Plant pests and their control* – Rev. British ed Butterworths & Co. Publishers, Londres.
- Fialová, S., Tekelová, D., Mrlianová, M., Grančai, D. (2008). The Determination of Phenolics compounds and antioxidant activity of Mints and balms cultivated in Slovakia. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comeniane. Tomus LV*. P. 96-102
- Franco, J. A. (1984). *Nova Flora de Portugal* (Continente e Açores). Volume II. Lisboa.
- Franco, J.C., Borges da Silva, E., Passos de Carvalho, J. (2000). *Cochonilhas-algodão (Hemiptera, Pseudococcidae) associadas aos citrinos em Portugal*. p. 73-77. ISA Press, Lisboa.
- Franzios, G., Mirotsoy, M., Hatzia Apostolou, E., Kral, J., Scouras, Z.G. & Mavragani-Tsipidou, P. (1997). Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, 45: 2690-2694.
- Gäde, G. (1990). The adipokinetic hormone/red pigment concentrating hormone peptide family: structures, interrelationships and functions. *J. Insects Physiol.*, 36: 1-12
- Gallo, D., Nakano, O., Neto, SS., Carvalho, R.P.L. (1970). *Manual de Entomologia. Pragas das Plantas e seu Controle*. Editora Agronômica Ceres, São Paulo.
- Gianessi, L. (2009). The Benefits of Insecticide Use: Mint. CropLife Foundation. Disponível em : http://www.croplifefoundation.org/Insecticide_Benefits/Crop_Studies/Combined_Document_Mint.pdf (Acedido em Setembro 2009)
- Goldsworthy, G.J. (1983). The endocrine control of flight metabolism in locusts. *Adv. Insect Physiol.*, 17: 149-204
- Gomez, K., Espadaler, X. (2007). Hormigas.org. Disponível em: <http://www.hormigas.org/> (Acedido em Outubro 2008)
- Gronenberg, W. (1999). Modality-Specific Segregation of Input to Ant Mushroom Bodies. *Brain Behav. Evol.*, 54: 85-95

- Gullan, P.J. & Cranston, P.S. (1994). *The insects – An Outline of Entomology*. p. 307-321 Chapman & Hall, Londres.
- Hall, D.G. & Bennett, F.D. (1994). Biological control and IPM of sugarcane in Florida. In: *Pest Management in the subtropics Biological Control – a Florida Perspective*. Rosen D, Bennett FD, Capinera JL (eds.). p.297-325 Intercept, Andover.
- Hammer, M. & Menzel, R. (1998). Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honey bees. *Learning Mem.*, 5: 146-156
- Hammer, M. (1993). An unidentified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature*, 366: 59-63
- Hammer, M. (1997). The neural basis of associative reward learning in honeybees. *Trends Neurosci.*, 20:245-252
- Han, K.A., Millar, N.S., Davis, R.L. (1998). A novel octopamine receptor with preferential expression in *Drosophila* mushroom bodies. *J. Neurosci.*, 18:3650-3658
- Hess, M., Barralis, G., Bleiholder, H., Buhr, L., Eggers, TH., Hack, H. & Stauss, R. (1997). Use the extended BBCH scale – general for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Res.*, 37: 433-441
- Helle, W. and Sabelis, M.W. (1985). *Spider mites: Their Biology, Natural Enemies and Control, World crop pests*, vol. 1A. Elsevier, Amsterdam.
- Hofmann, H.A., Stevenson, P.A. (2000). Flight restores fight in crickets. *Nature*, 403: 613
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. (1990). *The Ants*. p.732 Belknap - Harvard
- Hollingworth, R.M., Wright, N. (1984). In Magee, P.S., Kohn, G. K., Menn, J. J., (eds). Pesticide synthesis through rational approaches. ACS Symposium Series N.º 255. Washington, DC: American Chemical Society, p. 103-125
- Horner, C.E. (1955). Control of peppermint diseases. Station Bulletin 547, Agricultural Experiment Station, Oregon State University.
- Ilharco, F.A. (1973). *Catálogo dos Afídeos de Portugal Continental*. Estação Agronómica Nacional, Oeiras.
- Inomata, S., Tsuchiya, S., Ikeda, K., Saita, O., Ando, T. (2002). Identification of the Sex Pheromone Componentes Secreted by Female Moths of *Peridroma saucia* (Noctuidade: Noctuidae). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 : 2461 - 2464
- Isman, M.B. (2002). Problèmes et perspectives de commercialization des insecticides d'origine botanique In: *Biopesticides d'Origine Végétale*. Regnault-Roger C., Philogène B.J. & Vincent C. (coord.). 301-310 p. Editions TEC&DOC, Paris.
- Johnson, D.A., Douhan, L.I., Geary, B. (2002). Report of *Colletotrichum coccodes* Associated with *Mentha*. *Plant Dis.*, 86: 695
- Johnson, D.A., Zhang, H., Alldrege, J.R. (2006). Spatial pattern of *Verticillium Wilt* in Commercial Mint Fields. *Plant Dis.*, 90: 789-797
- Keeley L.L. (1978). Development and endocrine regulation of mitochondrial cytochrome biosynthesis in the insect fat body. *Archs Biochem. Biophys.*, 187: 87-95.

- Kutsukake, M., Komatsu, A., Yamamoto, D., Ishiwa-Chigusa, S. (2000). A tyramine receptor gene mutation causes a defective olfactory behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 245: 31-42
- Kyriakides M.A. & McCrohan C.R., 1989. Effect of putative rhythmic buccal motor output in *Lymnea stagnalis*. *J. Neurobiol.*, 20: 635-650
- Lacy, M.L., Stephens, C.T., Green, R.J.Jr., and York, A.C. (1981). *Mint Production in the Midwestern United States*, North Central Regional Extension Publication 155, Cooperative Extension Service, Michigan State University, East Lansing, MI, p. 18
- LaGasa, E.H. & Antonelli, A.L. (2000). 1999 Western Whashington *Tipula oleracea* Survey (Diptera: Tipulidae). 1999 Entomology Project Report - WSDA PUB 034 (N/1/00)
- Lahlou, M., 2004. Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. *Phytoterapy Res.*, 18: 435-448.
- Laurent, D., Vilaseca, L.A., Chantaine, J., Ballivian, C., Saavedra, G., Ibañes, R. (1997). Insecticidal Activity of Essential Oils on *Triatoma infestans*. *Phytoterapy Res.*, 11: 285-290
- Lindqvist, I. & Tuovinen, T. (2006). Black vine weevil and other wingless weevils: are there any affective control methods applicable in outdoor strawberry in Nordic Countries? In: NFJ Seminar n.º 389: Pest, disease and weed management in strawberry; Finlândia 8-9 Novembro 2006. p. 33
- Lucas, G.B., Campbell, C.L., Lucas, L.T. (1985). *Introduction to plant diseases*. The AVI publishing company, inc., Westport, Connecticut
- Malamud, J.G., Miszin, A.P., Josephson, R.K. (1988). The effects of octopamine on contraction kinsetica and power output of the locust flight muscle. *J. Comp Physiol*, 165: 827 – 835
- May, A., Tanaka, M.A.S., Silva, E.H.F.M., Moraes, A.R.A. (2008). Ferrugem da *Mentha citrata* no Estado de São Paulo. Série Tecnologia APTA. Boletim Técnico IAC, Campinas, n. 202, 2008 Instituto Agrônômico (IAC) Campinas
- Menzel, R., Michelsen, B., Rüffer, P. & Sugawa, M. (1988). Neuropharmacology of learning and memory in honey bees. In: Hertting, G. & Spatz, H., - C., (eds). *NATO ASI series H19, Modulation of synaptic plasticity in nervous systems*. Springer Verlag: Berlin – Heidelberg, p. 332-350
- Milde, J.J., Ziegler, R., Wallstein, M. (1995). Adipokinetic Hormone Stimulates Neurones in the Insect Central Nervous System. *The J. of Experim. Biology*, 198: 1307-1311
- Monteiro, A., Póvoa, O., Marinho, S., Rodrigues, L., Monteiro, P. (2008). *Mentha pulegium* e *Mentha cervina* - Os Poejos na boa Cozinha Portuguesa. ISA Press, Lisboa.
- Monteiro, P.T.M. (2006). *Mentha cervina* L. e *Mentha pulegium* L.. Propagação seminal e vegetativa e quantificação dos óleos essenciais. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de *Engenharia Agrônômica*. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Morris, M.A. (2006). Commercial mint species grown in the United States. In: *Mint. The genus Mentha*. Lawrence, B.M (Ed.) p.87-136. CRC Press Taylor & Francis Group, Londres.
- Mulas, M. (2006). Traditional Uses of *Labiatae* in the Mediterranean Area. In: *Proceedings of the First International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and*

- Utilization*. C. Cervelli, B. Ruffoni, C. Dalla Guda (eds.). Sanremo, Italy, February 22-25. *Acta Horticulturae* 723: 25-32.
- Mulloney, B., Acevedo, L.D. & Bradbury, A.G. (1987). Modulation of crayfish swimmeret rhythm by octopamine and the neuropeptide proctoloin. *J. Neurophysiol.*, 58: 584-597
- Nathanson, J.A. (1979). Octopamine receptors, adenosine 3' – 5' – monophosphate and neural control of firefly flashing. *Science*, 203:65-68
- Ngoh, S.P., Choo, L.E.W., Pang, F.Y., Huang, Y., Kini, M.R. & Ho, S.H. (1998). Insecticidal and Repellent Properties of Nine Volatile Constituents of Essential Oils against the american cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *Pesticide Sci.*, 54: 261-268
- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, Ravid, U., Yaniv, Z., Spiegel, Y. (2000). Nematicidal Activity of Essential Oils and Their Components Against the Root-Knot Nematode. *Phytopathology*, p. 710-715
- Orchard, I.(1982). Octopamine in insects: neurotransmitter, neurohormone and neuromodulator. *Can. J. Zool.*, 60: 659-669
- Orchard, I.(1987). Adipokinetic hormones – an update. *J. Insect Physiol.*, 33: 451-463
- Panda, N., & Khush, G.S. (1995). *Host plant resistance to insects*. CAB international, Reino Unido.
- Passos de Carvalho, J., Montalvão, M.U. (1989). *Contribuição para o inventário dos Noctuídeos de Portugal, Instituto Nacional de Investigação Agrária*. Estação Agronómica Nacional, Oeiras.
- Passos de Carvalho, J., Montalvão, M.U., Carvalho, M.P. (1985). Atlas provisório dos Noctuídeos de Portugal. Estação Agronómica Nacional, Oeiras.
- Pavela, R. (2007). Isecticidal Properties of Several Essential Oils on the House Fly (*Musca domestica* L.). *Phytotherapy Research*. Published online in Wiley InterScience, (www.interscience.wiley.com).
- Peterson, C. & Coats, J. (2001). Insects Repellents – past, present and future. *Pesticide Outlook*, 154-157
- Philogène, B.J.R., Regnault-Roger, C., Vincent, C. (2002). Produits phytosanitaires insecticides d'origine végétale: promesses d'hier et d'aujourd'hui In: *Biopesticides d'Origine Végétale*. Regnault-Roger C., Philogène B.J. & Vincent C. (coord.). p. 1-15 Editions TEC&DOC, Paris.
- Póvoa, O.L.V. (2008). Produção e utilização dos *taxa Mentha pulegium* L. e *Mentha cervina* L.. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Pschiedt, J.W. and Ocamb, C.M. (2004). *Pacific Northwest Plant Disease Management Handbook*, Oregon State University, Corvallis.
- Quintana, S.V. (2005). *Plagas y Enfermedades de Jardines*. 2º Edición revisada y ampliada. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Regnault-Roger, C. (2002). De nouveaux phyto-insecticides pour le troisième millénaire? In: *Biopesticides d'Origine Végétale*. Regnault-Roger C., Philogène B.J. & Vincent C. (coord.). p. 19-34 Editions TEC&DOC, Paris.

- Regnault-Roger, C., Hamraoui, A. (1993). Efficiency of plants from south of France used as traditional protectant of *Phaseolus vulgaris* L. against its bruchid *Acanthoscelides obtectus* Say. *J. Stored Prod. Res.*, 29:259-264
- Regnault-Roger, C., Hamraoui, A. (1993). Influence d'huiles essentielles sur *Acanthoscelides obtectus* Say, bruche du haricot. *Acta Bot. Gallica*, 140:217-222
- Rezk, H.A. (2001). The False Spider Mite, *Brevipalpus obovatus* Donnadieu (Acari: Tenuipalpidae): Host-Related Biology, Seasonal abundance and control. In: *Acarology- Poceedings of the 10th International Congress. 1998, Canberra, Australia*. R.B. Halliday, D.E. Walter, H.C. Proctor, R.A. Norton & M.J. Colloff (eds.), 291-294
- Rodrigues, L., Monteiro, P., Póvoa, O., Teixeira, G., Moldão, M., Figueiredo, A.C. & Monteiro, A. (2008) Morphology of secretory structures and essential oil composition of *Mentha cervina* L. from Portugal. *Flavour and Fragrance J.*, 23: 340-347.
- Roeder, T. (1990). High – affinity antagonists of the locust neuronal octopamine receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 191:221- 224
- Roeder, T. (1992). A new octopamine receptor class in locust nervous tissue, the octopamine 3 (OA3) receptor. *Life Sci.*, 50:21-28
- Roeder, T. (1994). Biogenic amines and their receptors in insects. *Comp Biochem* 107C: 1-12
- Roeder, T., Degen, J. & Gewecke, M. (1998). Epinastine, a highly specific antagonist of the insect neuronal octopamine receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 349: 171-179
- Roeder, T., Gewecke, M. (1999). Octopamine receptors in locust nervous tissue. *Biochem. Pharmacol.*, 39:1793-1797
- Roeder, T., Seifert, M., Kähler, C., Gewecke, M. (2003). Tyramine and Octopamine: Antagonistic Modulators of Behavior and Metabolism. *Archives of Insect Biochem. and Physiol.*, 54: 1-13
- Rollo, C.D., Borden, J.H., Casey, I.B. (1995). Endogenously produced repellent from American cockroach (Blattaria: Blattidae): function in death recognition. *Environmental Entomol.*, 24: 116-124
- Rung, A., Halbert, S.E., Ziesk, D.C., Gill, R.J. (2009). A Leafhopper Pest of Plants in the Mint Family, *Eupteryx decemnotata* Rey (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae), Ligurian Leafhopper, New to North America. *Insecta Mundi* 0088, July 2009. p. 1-4
- Rutledge, L.C., Gupta, R.K., Mehr, Z.A. (1997). Evolution of repellent tolerances in representative arthropodes. *J. of the American Mosquito Control Association*, 13 : 329-334
- Saljoqi, A.U.R., Afridi, M.K., Khan, S.A., Sadur-Rehman (2006). Effects of six plant extracts on rice weevil *Sitophilus oryzae* L. in the stored wheat grains. *J. of Agricultural and Biological Sci.*, 1:1-5
- Saudou, F., Amlaiky, N., Plassant, J.L., Borrelli, E., Hen, R. (1990). Cloning and characterization of a *Drosophila* tyramine receptor. *EMBO .j.*, 9: 3611 – 3617
- Shadia, E., El – Aziz, A., Omer, E.A. & Sabra, A.S. (2007). Chemical Composition of *Ocimum americanum* Essential Oil ans Its Biological Effects Against *Agrotis ipsilon*, (Lepidoptera: Noctuidae). *Research J. of agriculture and Biological Sci.*, 3: 740-747
- Sombati, S. & Hoyle, G. (1984 a). Central nervous sensitization and dishabituation of reflex action in an insect by the neuromodulator octopamine. *J. Neurobiol.*, 15: 455-480

- Sombati, S. & Hoyle, G. (1984b). Generation of specific behaviours in a locust by local release in to the neuropil of the natural neuromodulator octopamine. *J. Neurobiol.*, 15: 455-480
- Stevenson, A.P., Dyakonova, V., Rillich, J., Shildberger, K. (2004). Octopamine and Experience-Dependent Modulation of Aggression in Crickets. *The J. of Neurosc.* 25: 1431-1441
- Stoll, G. (2002). *Protection Naturelle des Vegetaux en Zones Tropicales Vers une Dynamique de L'information*. Margraf Verlag, Alemanha.
- Traboulsi, A.F., Taoubi, K., El-Haj, S., Bessiere, J.M., Rammal, S. (2002). Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Sci.*, 58: 491-495
- Trigo, R.J.S. (1997). Estudo comparativo de processos de extracção de aroma de poejo (*Mentha pulegium* L.). Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agro-Industrial. UTL, ISA, Lisboa.
- Tucker, O.A., Naczi, R.F.C. (2006). *Mentha*: an Overview of its Classification and Relationships. In: *Mint. The genus Mentha*. Lawrence, B.M (Ed.) p.1-39. CRC Press Taylor & Francis Group, Londres.
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. & Webb, D.A. (eds) (1972). *Flora Europaea. Volume 3 – Diapensicaceae to Myoporaceae*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Valdês, B., Talavera, S. & Fernández-Galiano, E., (eds) (1987). *Flora Vascular de Andalucía Occidental*. Volume 2. Ketres Editora, Barcelona.
- Weller, S., Green, R.Jr., Janssen, C., Whithford, F., (sem data). Mint prouction and Pest Management in Indiana. Arlene Blessing, Drew Martin, Cindy Myers (eds.)
- Westcott, C. (1971). *Plant disease handbook*. Third edition. Van Nostrand Reinhold Company, Nova Iorque.
- Xavier, D., Ribeiro, C., Farias, R. (2006). Caracterização de populações de hortelã-de-água (*Mentha aquatica* L.) e de poejo (*Mentha pulegium* L.) no Entre Douro e Minho. V Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas, IV Congresso Iberoamericano de Ciências Hortícolas. Actas da Associação Portuguesa de Horticultura, 1: 622-626.
- Yodav, R.S., Kuman, S. & Dikshit, A. (2006). Antifungal properties of essential oil of *Mentha spicata* L. var. Mss-5. *Indian J. Crop Science*, 1 : 197 - 200
- Ziegler, R., Eckart, K., Law, J.H. (1990). Adipokinetic hormone controls lipid metabolism in adults and carbohydrate metabolism in larvae of *Manduca Sexta*. *Peptides*, 11: 1037-1040
- Zimowska, B. (2007). Fungi colonizing and damaging different parts of peppermint (*Mentha piperita* L.) cultivated in South-Eastern Poland. *Herba Polonica*, 53: 97-105

ANEXOS

Anexo A – Análise de Variância

A1 – Análise de variância relativamente a *Tapinoma nigerrimum*

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: h24t

Modalidade	Mean	Std. Deviation	N
1,00	18,4349	,00000	3
2,00	18,4349	,00000	3
3,00	28,0772	10,48042	3
4,00	30,2925	10,70105	3
5,00	,0000	,00000	3
6,00	,0000	,00000	3
Total	15,8733	13,43916	18

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: h24t

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2621,682 ^a	5	524,336	14,023	,000
Intercept	4535,284	1	4535,284	121,290	,000
Modalidade	2621,682	5	524,336	14,023	,000
Error	448,703	12	37,392		
Total	7605,670	18			
Corrected Total	3070,385	17			

a. R Squared = ,854 (Adjusted R Squared = ,793)

Post Hoc Tests

Modalidade

Homogeneous Subsets

h24t

(1)	Modalidade	N	Subset	
			1	2
Tukey HSD ^{a,b}	5,00	3	,0000	
	6,00	3	,0000	
	1,00	3		18,4349
	2,00	3		18,4349
	3,00	3		28,0772
	4,00	3		30,2925
	Sig.		1,000	,239

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 37,392.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

(1)	Modalidade
1,00	= Água
2,00	= Etanol
3,00	= OE10
4,00	= OE2,5
5,00	= OE20
6,00	= OE5

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: h48t

Modalidade	Mean	Std. Deviation	N
1,00	18,4349	,00000	3
2,00	18,4349	,00000	3
3,00	47,2153	15,23331	3
4,00	40,8619	15,17784	3
5,00	30,9956	3,83699	3
6,00	15,0000	13,61156	3
Total	28,4904	15,35336	18

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: h48t

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2682,499 ^a	5	536,500	4,859	,012
Intercept	14610,703	1	14610,703	132,340	,000
Modalidade	2682,499	5	536,500	4,859	,012
Error	1324,835	12	110,403		
Total	18618,037	18			
Corrected Total	4007,334	17			

a. R Squared = ,669 (Adjusted R Squared = ,532)

Post Hoc Tests

Modalidade

Homogeneous Subsets

h48t

	Modalidade	N	Subset	
			1	2
Tukey HSD ^{a,b}	6,00	3	15,0000	
	1,00	3	18,4349	18,4349
	2,00	3	18,4349	18,4349
	5,00	3	30,9956	30,9956
	4,00	3	40,8619	40,8619
	3,00	3		47,2153
	Sig.		,088	,050

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 110,403.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: h72t

Modalidade	Mean	Std. Deviation	N
1,00	18,4349	,00000	3
2,00	33,2109	,00000	3
3,00	47,2153	15,23331	3
4,00	62,0069	25,78330	3
5,00	39,1475	5,89499	3
6,00	19,9253	17,57287	3
Total	36,6568	19,75328	18

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: h72t

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4152,491 ^a	5	830,498	4,017	,023
Intercept	24186,981	1	24186,981	116,997	,000
Modalidade	4152,491	5	830,498	4,017	,023
Error	2480,778	12	206,731		
Total	30820,249	18			
Corrected Total	6633,269	17			

a. R Squared = ,626 (Adjusted R Squared = ,470)

Post Hoc Tests

Modalidade

Homogeneous Subsets

h72t

Modalidade	N	Subset	
		1	2
Tukey HSD ^{a,b} 1,00	3	18,4349	
6,00	3	19,9253	
2,00	3	33,2109	33,2109
5,00	3	39,1475	39,1475
3,00	3	47,2153	47,2153
4,00	3		62,0069
Sig.		,213	,213

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 206,731.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: h96t

Modalidade	Mean	Std. Deviation	N
1,00	18,4349	,00000	3
2,00	39,2315	,00000	3
3,00	51,1450	10,64342	3
4,00	62,0069	25,78330	3
5,00	39,1475	5,89499	3
6,00	26,0703	7,40039	3
Total	39,3394	18,04252	18

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: h96t

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3798,898 ^a	5	759,780	5,254	,009
Intercept	27856,521	1	27856,521	192,650	,000
Modalidade	3798,898	5	759,780	5,254	,009
Error	1735,156	12	144,596		
Total	33390,575	18			
Corrected Total	5534,054	17			

a. R Squared = ,686 (Adjusted R Squared = ,556)

Post Hoc Tests

Modalidade

Homogeneous Subsets

h96t

	Modalidade	N	Subset	
			1	2
Tukey HSD ^{a,b}	1,00	3	18,4349	
	6,00	3	26,0703	
	5,00	3	39,1475	39,1475
	2,00	3	39,2315	39,2315
	3,00	3	51,1450	51,1450
	4,00	3		62,0069
	Sig.		,052	,255

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 144,596.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: h144t

Modalidade	Mean	Std. Deviation	N
1,00	18,4349	,00000	3
2,00	39,2315	,00000	3
3,00	51,1450	10,64342	3
4,00	62,0069	25,78330	3
5,00	39,1475	5,89499	3
6,00	26,0703	7,40039	3
Total	39,3394	18,04252	18

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: h144t

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3798,898 ^a	5	759,780	5,254	,009
Intercept	27856,521	1	27856,521	192,650	,000
Modalidade	3798,898	5	759,780	5,254	,009
Error	1735,156	12	144,596		
Total	33390,575	18			
Corrected Total	5534,054	17			

a. R Squared = ,686 (Adjusted R Squared = ,556)

Post Hoc Tests

Modalidade

Homogeneous Subsets

h144t

Modalidade	N	Subset	
		1	2
Tukey HSD ^{a, b} 1,00	3	18,4349	
6,00	3	26,0703	
5,00	3	39,1475	39,1475
2,00	3	39,2315	39,2315
3,00	3	51,1450	51,1450
4,00	3		62,0069
Sig.		,052	,255

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 144,596.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

A2 – Análise de variância relativamente a *Aphaenogaster senilis*

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: h24t

Modalidade	Mean	Std. Deviation	N
1,00	,0000	,00000	5
2,00	,0000	,00000	5
3,00	,0000	,00000	5
4,00	30,1307	7,92630	5
5,00	10,6260	14,55028	5
6,00	,0000	,00000	5
Total	6,7928	12,88910	30

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: h24t

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3719,591 ^a	5	743,918	16,258	,000
Intercept	1384,256	1	1384,256	30,253	,000
Modalidade	3719,591	5	743,918	16,258	,000
Error	1098,147	24	45,756		
Total	6201,995	30			
Corrected Total	4817,738	29			

a. R Squared = ,772 (Adjusted R Squared = ,725)

Post Hoc Tests

Modalidade

Homogeneous Subsets

h24t

	Modalidade	N	Subset	
			1	2
Tukey HSD ^{a,b}	1,00	5	,0000	
	2,00	5	,0000	
	3,00	5	,0000	
	6,00	5	,0000	
	5,00	5	10,6260	
	4,00	5		30,1307
	Sig.		,169	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 45,756.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: h48t

Modalidade	Mean	Std. Deviation	N
1,00	,0000	,00000	5
2,00	,0000	,00000	5
3,00	,0000	,00000	5
4,00	40,2844	7,63757	5
5,00	16,8463	17,07097	5
6,00	,0000	,00000	5
Total	9,5218	16,82795	30

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: h48t

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6813,212 ^a	5	1362,642	23,376	,000
Intercept	2719,928	1	2719,928	46,661	,000
Modalidade	6813,212	5	1362,642	23,376	,000
Error	1399,002	24	58,292		
Total	10932,141	30			
Corrected Total	8212,214	29			

a. R Squared = ,830 (Adjusted R Squared = ,794)

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

h48t

Modalidade	N	Subset		
		1	2	3
Tukey HSD ^{a,b}				
1,00	5	,0000		
2,00	5	,0000		
3,00	5	,0000		
6,00	5	,0000		
5,00	5		16,8463	
4,00	5			40,2844
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 58,292.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: h72t

Modalidade	Mean	Std. Deviation	N
1,00	,0000	,00000	5
2,00	,0000	,00000	5
3,00	,0000	,00000	5
4,00	42,6926	8,91481	5
5,00	25,8463	17,81505	5
6,00	,0000	,00000	5
Total	11,4232	18,68634	30

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: h72t

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8538,799 ^a	5	1707,760	25,820	,000
Intercept	3914,652	1	3914,652	59,186	,000
Modalidade	8538,799	5	1707,760	25,820	,000
Error	1587,400	24	66,142		
Total	14040,851	30			
Corrected Total	10126,199	29			

a. R Squared = ,843 (Adjusted R Squared = ,811)

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

h72t

Modalidade	N	Subset		
		1	2	3
Tukey HSD ^{a, b}				
1,00	5	,0000		
2,00	5	,0000		
3,00	5	,0000		
6,00	5	,0000		
5,00	5		25,8463	
4,00	5			42,6926
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 66,142.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: h96t

Modalidade	Mean	Std. Deviation	N
1,00	,0000	,00000	5
2,00	,0000	,00000	5
3,00	,0000	,00000	5
4,00	49,8407	7,99940	5
5,00	27,1755	18,12727	5
6,00	23,4885	15,24042	5
Total	16,7508	21,13449	30

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: h96t

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	10453,894 ^a	5	2090,779	20,076	,000
Intercept	8417,654	1	8417,654	80,828	,000
Modalidade	10453,894	5	2090,779	20,076	,000
Error	2499,434	24	104,143		
Total	21370,981	30			
Corrected Total	12953,328	29			

a. R Squared = ,807 (Adjusted R Squared = ,767)

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

h96t

	Modalidade	N	Subset		
			1	2	3
Tukey HSD ^{a, b}	1,00	5	,0000		
	2,00	5	,0000		
	3,00	5	,0000		
	6,00	5		23,4885	
	5,00	5		27,1755	
	4,00	5			49,8407
	Sig.		1,000	,992	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 104,143.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: h144t

Modalidade	Mean	Std. Deviation	N
1,00	,0000	,00000	5
2,00	,0000	,00000	5
3,00	,0000	,00000	5
4,00	53,4026	8,13622	5
5,00	27,1755	18,12727	5
6,00	32,9608	6,33478	5
Total	18,9232	22,26869	30

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: h144t

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12641,239 ^a	5	2528,248	34,878	,000
Intercept	10742,571	1	10742,571	148,199	,000
Modalidade	12641,239	5	2528,248	34,878	,000
Error	1739,701	24	72,488		
Total	25123,511	30			
Corrected Total	14380,941	29			

a. R Squared = ,879 (Adjusted R Squared = ,854)

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

h144t

	Modalidade	N	Subset		
			1	2	3
Tukey HSD ^{a,b}	1,00	5	,0000		
	2,00	5	,0000		
	3,00	5	,0000		
	5,00	5		27,1755	
	6,00	5		32,9608	
	4,00	5			53,4026
	Sig.		1,000	,887	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 72,488.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: h168t

Modalidade	Mean	Std. Deviation	N
1,00	,0000	,00000	5
2,00	,0000	,00000	5
3,00	,0000	,00000	5
4,00	54,5563	6,97265	5
5,00	36,1755	11,78081	5
6,00	37,8015	7,95319	5
Total	21,4222	23,34549	30

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: h168t

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	14802,712 ^a	5	2960,542	70,866	,000
Intercept	13767,340	1	13767,340	329,548	,000
Modalidade	14802,712	5	2960,542	70,866	,000
Error	1002,634	24	41,776		
Total	29572,686	30			
Corrected Total	15805,346	29			

a. R Squared = ,937 (Adjusted R Squared = ,923)

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

h168t

Modalidade	N	Subset		
		1	2	3
Tukey HSD ^{a, b}				
1,00	5	,0000		
2,00	5	,0000		
3,00	5	,0000		
5,00	5		36,1755	
6,00	5		37,8015	
4,00	5			54,5563
Sig.		1,000	,999	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 41,776.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: h192t

Modalidade	Mean	Std. Deviation	N
1,00	,0000	,00000	5
2,00	,0000	,00000	5
3,00	,0000	,00000	5
4,00	58,3684	6,93771	5
5,00	43,6204	9,96094	5
6,00	41,2626	10,90343	5
Total	23,8752	25,61330	30

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: h192t

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	17960,239 ^a	5	3592,048	80,951	,000
Intercept	17100,790	1	17100,790	385,389	,000
Modalidade	17960,239	5	3592,048	80,951	,000
Error	1064,948	24	44,373		
Total	36125,978	30			
Corrected Total	19025,187	29			

a. R Squared = ,944 (Adjusted R Squared = ,932)

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

h192t

Modalidade	N	Subset		
		1	2	3
Tukey HSD ^{a, b}				
1,00	5	,0000		
2,00	5	,0000		
3,00	5	,0000		
6,00	5		41,2626	
5,00	5		43,6204	
4,00	5			58,3684
Sig.		1,000	,993	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 44,373.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Anexo B

Quadro B1 – Distribuição dos artrópodes associados a plantas de género *Mentha* nos países da Europa e respectivas regiões autónomas, elaborado com base em Fauna Europaea Web Service (2004) (Continua).

Ordem	Família	Espécie	País/Região ⁽¹⁾
Coleoptera	Chrysomelidae	<i>Diabrotica undecimpunctata</i> Mannerheim	Sem informação
		<i>Longitarsus ferrugineus</i> Foudras	A(3;5), B(1;2), C(3;5), D1, E(1;2;3), F2, H1, I(2;3), L(1;3;4), R1, S(2;4;5)
	Curculionidae	<i>Otiorhynchus ovatus</i> Linnaeus	A(3;5), B(1;3), D1, E(1; 4), F(1; 2), G2, H(1; 2), I3, L(1; 3; 4), M4, N1, P1, R(1; 2), S(4;5)
		<i>Otiorhynchus rugosostriatus</i> Goeze	A(1; 3; 5), B1, C5, D1, E1, F2, G2, H(1; 2), I(10; 12;13), L4, P1, R(1; 2), S(4; 5)
		<i>Otiorhynchus sulcatus</i> Fabricius	A(1; 2; 3; 5), B(1; 2; 4), C5, D1, E4, F(1; 2), H(1; 2), I(2; 10; 12; 13), L4, N1, P1, R(1; 3), S5
		<i>Pseudobaris nigrina</i> Say	Sem informação
		<i>Sciopithes obscurus</i> Horn	Sem informação
	Elateridae	<i>Ctenicera pruinina</i> Horn	Sem informação
		<i>Limonius californicus</i> Mannerheim	Sem informação
		<i>Limonius canus</i> LeConte	Sem informação
Diptera	Tipulidae	<i>Tipula oleracea</i> Linnaeus	A(3; 5), B(1; 3), C(3; 4; 5), D1, E(1; 2; 3; 4), F(1; 2), G2, H(1; 2), I(1; 2; 4; 6; 10; 13), J1, L(3; 4), M(1; 3), P(1; 2), R(1; 2; 3), S(2; 3; 4; 5), U1
		<i>Tipula paludosa</i> Meigen	A(1; 3; 4), B(1; 2; 3), C(3; 5), D1, E(1; 2; 3; 4), F(1; 2), H(1; 2), I(2; 4; 7; 10; 13), J1, L(1; 3; 4), M(1; 2), N1, P(1; 2), R(1; 2), S(4; 5), U1
Hemiptera	Aphididae	<i>Ovatus crataegarius</i> Walker	A(1; 3; 4; 5), B(1; 2; 4), D1, E(1; 2; 3; 4), F(1; 2), G2; H2; I(2; 10; 11; 13), J1, L(1; 3), M2, P(1; 2), R(1; 2; 3), S(2; 3; 4), U1
Homoptera	Aleyrodidae	<i>Trialeurodes vaporariorum</i> Westwood	A(3; 5), B1, D1, E3, F2, H2, I(2; 3; 4), M2, N1, P1, R2, S(4; 5)

Quadro B1 – (continuação) Distribuição dos artrópodes associados a plantas de género *Mentha* nos países da Europa e respectivas regiões autónomas, elaborado com base em Fauna Europaea Web Service (2004).

Ordem	Família	Espécie	País/Região ⁽¹⁾
Lepidoptera	Noctuidae	<i>Agrotis ipsilon</i> Hufnagel	Presente em todos, excepto: F3, I9, S6, T1
		<i>Autographa californica</i> Speyer	Sem informação
		<i>Mamestra configurata</i> Walker	Sem informação
		<i>Peridroma saucia</i> Hübner	Presente em todos, excepto: C2, F3, I9, K1, M5, R3, S (1; 6), T1
		<i>Spodoptera praefica</i> Grote	Sem informação
		<i>Trichoplusia ni</i> Hübner	Presente em todos, excepto: A4, B2, C2, F3, I(3, 7, 8, 1112), K1, L(1; 3; 4), M(4; 5), N1, S(1; 6), T1
		<i>Xestia Megasema c-nigrum</i> Linnaeus	Presente em todos, excepto: C2, F3, I(1; 5; 6; 8; 9), M5, S(1; 6), T1
Lepidoptera	Nymphalidae	<i>Vanessa cardui</i> Linnaeus	Presente em todos, excepto: C2, F3; I(/; 9), K1, M(4; 5), S(1; 6), T1
Lepidoptera	Pyalidae	<i>Fumibotys fumalis</i> Guenée	Sem informação
		<i>Udea profundalis</i> Packard	Sem informação
Orthoptera	Acrididae	<i>Melanoplus spp.</i> Stål	Sem informação
Prostigmata	Tarsonemidae	<i>Floridotarsonemus</i> spp. Attiah	A (5; 3), B2, D1, E1, F2, G2, H (1; 2), I(2; 7; 10; 11, 13), K1, P(1; 2), R(1; 3), S(3; 4; 5), U1
Prostigmata	Tetranychidae	<i>Tetranychus urticae</i> Koch	A(3; 5), B(1; 4), C(1; 3), D1, E3, F2, G2, H(1; 2), I(2; 4; 13), J1, L1, M2, N1, P(1; 2), R(1; 2; 3), S(4; 5), T2, U1
Symphyla	Scutigerellidae	<i>Scutigerella immaculata</i> Newport	A(2; 3; 5), B(1; 3), C(3; 4), D1, E(1; 2; 3; 4), F(1; 2), G2, H(1; 2), I(2; 3; 10; 11; 13), J1, L4, M5, N1, P(1; 2), R(1; 2; 3), S(2; 4; 5)

(1)

A1 = Açores	H1 = Holanda	M4 = Moldávia
A2 = Albânia	H2 = Hungria	M5 = Mónaco
A3 = Alemanha	I1 = Ilhas Baleares	N1 = Noruega (Continental)
A4 = Andorra	I2 = Ilhas Britânicas	P1 = Polónia
A5 = Áustria	I3 = Ilhas Canal	P2 = Portugal (Continental)
B1 = Bélgica	I4 = Ilhas Canárias	R1 = República Checa
B2 = Bielorrússia	I5 = Ilhas Cíclades	R2 = Roménia
B3 = Bósnia e Herzegovina	I6 = Ilhas Dodecaneso	R3 = Rússia
B4 = Bulgária	I7 = Ilhas Faroé	S1 = S. Marino
C1 = Chipre	I8 = Ilhas Mar Egeu (Norte)	S2 = Sardenha
C2 = Cidade do Vaticano	I9 = Ilhas Selvagens	S3 = Sicília
C3 = Córsega	I10 = Irlanda	S4 = Suécia
C4 = Creta	I11 = Irlanda do Norte	S5 = Suíça
C5 = Croácia	I12 = Islândia	S6 = Svalbard & Jan Mayen
D1 = Dinamarca (Continental)	I13 = Itália (Continental)	T1 = Terra Nova
E1 = Eslováquia	J1 = Jugoslávia	T2 = Turquia
E2 = Eslovénia	K1 = Kaliningrad	U1 = Ucrânia
E3 = Espanha (Continental)	L1 = Letónia	
E4 = Estónia	L2 = Liechtenstein	
F1 = Finlândia	L3 = Lituânia	
F2 = França (Continental)	L4 = Luxemburgo	
F3 = Franz Josef Land	M1 = Macedónia	
G1 = Gibraltar	M2 = Madeira	
G2 = Grécia (Continental)	M3 = Malta	

Anexo C

Quadro C1 – Fungos isolados nas populações de *Mentha cervina* (0 = ausência; 1 = presença).

[illegible]

